

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. F. Großmann

Über die Hemmung pektischer und zellulolytischer Enzyme von Rhizoctonia solani Kühn und den Einfluß einiger Hemmstoffe auf den Krankheitsprozeß

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Josef Martin

Diplom-Landwirt

aus Ruhlkirchen, Krs. Alsfeld

Gießen 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
310 PASTEUR ROAD
REDWOOD CITY, CALIFORNIA

Über die Hemmung
pektischer und zellulolytischer Enzyme von
Rhizoctonia solani Kühn und den Einfluß
einiger Hemmstoffe auf den Krankheitsprozeß

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Josef Martin

Diplom-Landwirt

aus Ruhlkirchen, Krs. Alsfeld

Gießen 1967

Über die Hemmung
pektischer und zellulolytischer Enzyme von
Rhizoctonia solani Kühn und den Einfluß
einiger Hemmstoffe auf den Krankheitsprozeß

Dissertation

zur

Erhebung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Professor Dr. P. Meimberg

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Großmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Linser

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 1967

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</u>	6
B. <u>UNTERSUCHUNGEN IN VITRO</u>	14
I. <u>Material und Methoden</u>	14
1. Verwendete Pilzstämmе	14
2. Herstellung der Enzympräparate	14
3. Herstellung der Substrate	15
4. Messung der Enzymaktivität	16
5. Versuche zur Hemmung von C_x und PG	17
6. Versuche zur PME-Hemmung	18
7. Fungitoxizitätstest	19
II. <u>Ergebnisse</u>	20
1. PG- und C_x -Aktivität verschiedener Pilz- stämmе in ^x einem gepufferten Nährmedium	20
2. Wachstum und enzymatische Aktivität (C_x und PG) des Stammes R-B	21
a) Zeitlicher Verlauf der Enzymsynthese, des Myzelwachstums und der pH-Wert- Veränderung der Nährlösung	21
b) Vergleich der Wirkung verschiedener C-Quellen auf das Myzelwachstum sowie die PG- und C_x -Aktivität des Pilzes	23
c) Wirkung unterschiedlicher Vorkultur des Inokulums auf Myzelwachstum, PG- und C_x -Synthese	25
3. Versuche mit Hemmstoffen	28
a) Enzymkonzentration und Hemmeffekt	28
b) Auslese wirksamer Inhibitoren gegenüber PG und C_x	30
c) PME-Hemmung ausgewählter Substanzen	40
d) Untersuchungen über die Fungitoxizität einiger besonders wirksamer Enzyminhibi- toren	41

	<u>Seite</u>
<u>C. VERSUCHE IN VIVO</u>	43
<u>I. Material und Methoden</u>	43
1. Versuche mit Kartoffelgewebe und Bohnen- hypokotylen	43
a) Infiltration von Kartoffelknollengewebe	43
b) Infiltration von Bohnenhypokotylen	46
c) Einstellen von Bohnenkeimlingen in Hemm- stoff-Lösungen	47
d) Messung und Auswertung des Befalls	48
2. Versuche an bewurzelten Bohnenkeimlingen	48
a) Bohnenkeimlinge mit Kotyledonen	48
b) Bohnenkeimlinge ohne Kotyledonen	50
<u>II. Ergebnisse</u>	52
1. Versuche mit Kartoffelknollengewebe	52
a) Einfluß der Vorbehandlung der Gewebe auf die beim Infiltrieren. aufgenommene Inhibitormenge	52
b) Infiltration von Kartoffelknollengewebe ohne vorherige Wärmebehandlung	53
c) Infiltration der Lösungen in Gewebe wärmebehandelter Knollen	56
2. Versuche mit Bohnenhypokotylen	59
a) Einfluß der Vorkultur des Inokulums, der Vorbehandlung der Hypokotyle und der rel. Luftfeuchtigkeit auf die Mazeration	59
b) Einfluß der Temperatur auf die Mazeration	60
c) Infiltration etiolierter Bohnenhypokotyle	61
d) Resorption der Hemmstoffe durch Einstel- len abgeschnittener Keimpflanzen in deren Lösungen	64
3. Versuche mit bewurzelten Keimpflanzen in Sandkultur	69
a) Vergleich der Pathogenität der Stämme C 7 und R-B auf Bohnenkeimlingen	69
b) Beeinflussung des Krankheitsbefalls an Pflanzen mit Kotyledonen	70
c) Beeinflussung des Krankheitsbefalls an Pflanzen ohne Kotyledonen	71

D. <u>DISKUSSION</u>	73
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	89
F. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	92

A. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

=====

In den letzten Jahren ist pektolytischen und zellulolytischen Prozessen eine zunehmende Bedeutung für die Pathogenese von Pflanzenkrankheiten beigemessen worden. Der Grund dafür liegt einerseits im Aufbau der pflanzlichen Gewebe, an dem Pektine und Zellulose maßgeblich beteiligt sind, zum anderen in Beziehungen zwischen der Enzymsynthese pflanzlicher Parasiten in vitro und ihrer Pathogenität. Ohne auf die in dieser Richtung erfolgten Untersuchungen im einzelnen eingehen zu können, seien die für die Durchführung der vorliegenden Arbeit maßgeblichen Gesichtspunkte kurz skizziert.

Pektische Substanzen und Zellulose in der höheren Pflanze

Nach HENGLEIN (1958) ist der Grundbaustein der Pektine die D-Galakturonsäure. Die einzelnen Galakturonsäureglieder sind durch α -1,4-Bindungen miteinander verkettet. Sie bilden auf diese Weise zunächst die sogenannte Polygalakturonsäure oder Pektinsäure, welche in Wasser unlöslich ist und, vor allem mit Ca und Mg, als Pektate bezeichnete Salze bildet. Bei den Pektinen im eigentlichen Sinne sind die Carboxylgruppen der Galakturonsäurereste teilweise methoxyliert. Bei gleichem Polymerisationsgrad sind Pektine um so besser löslich, je höher der Veresterungsgrad mit CH_3OH ist. Sie finden sich in den pflanzlichen Geweben in erster Linie in der primären Zellmembran und der Mittellamelle (vgl. hierzu auch McCLENDON 1964). Während das Pektin der Mittellamelle einen hohen Ca-Gehalt aufweist und eine Art Kittsubstanz zwischen den einzelnen Zellen darstellt, ist das der primären Zellwand höher verestert. Natives, wasserunlösliches Pektin wird auch als "Protopektin" bezeichnet (JOSLYN 1962).

Pektine konnten auch unter der Cutinschicht der Außenmembran nachgewiesen werden (MADER 1958, HEINEN und BRAND 1963). Zellulose ist ebenfalls in allen höheren Pflanzen weit verbreitet. Sie besteht nach NORKRANS (1963) aus Ketten von β -1,4-verbundenen D-Glukoseresten, die mehr oder weniger

parallel zueinander zu kleineren Aggregaten, den sogenannten Mizellen, angeordnet sind. Polymerisationsgrade von 6000 - 8000 können hierbei angenommen werden. Die Molekulargewichte betragen zwischen 1×10^6 und $1,3 \times 10^6$. Die Glukoseanhydridkette durchzieht mehrere Mizellen und verbindet sie auf diese Weise miteinander. Die Zellulose ist eingelagert in eine Kohlenhydrat-Matrix, welche aus Hemizellulosen und pektischen Substanzen gebildet wird. Als Bestandteil der primären und vor allem der sekundären Zellwand kommt ihr eine außerordentliche Bedeutung als Skelettsubstanz, welche in erster Linie die Struktur und Festigkeit des Pflanzengewebes bewirkt, zu (RANBY 1958). Ausgereiftes Holzgewebe enthält etwa 40 - 60 %, Stroh, Gras und anderes nicht verholztes Gewebe nur etwa 12 % des Trockengewichtes an Zellulose.

Pektische und zellulolytische Enzyme

Hier sei auf die sehr ausführlichen Übersichtsreferate von WOOD (1960), TOMIYAMA (1963), OWENS (1963), BROWN (1965) und BATEMAN und MILLAR (1966) sowie, speziell hinsichtlich der zellulolytischen Enzyme, auf die von NORKRANS (1963), REESE (1963) und MANDELS und REESE (1965) verwiesen, die für die Erörterung der im folgenden Abschnitt zu behandelnden Fragen als Grundlage dienen.

Vor allem bei pilzlichen Krankheiten, von denen die höhere Pflanze befallen werden kann, muß der Erreger in der Regel die pflanzlichen Kitt- und Festigungssubstanzen durchbrechen, um in das Gewebe einzudringen und sich innerhalb desselben auszubreiten. Während das Eindringen unter Umständen durch Wunden, Spaltöffnungen oder auch auf mechanischem Wege durch die intakte Kutikula erfolgen kann, scheint für eine intra- oder interzelluläre Ausbreitung die Mitwirkung vom Pathogen ausgeschiedener lytischer Substanzen unbedingt erforderlich zu sein. Besonders trifft dies auf Krankheiten wie Naß- und Weichfäulen zu, bei denen auch makroskopisch eine Auflösung des gesamten Zellverbandes beobachtet werden kann. Hier wurden schon frühzeitig vor allem pektische Enzyme als wesentlich verantwortlich nach-

gewiesen (BROWN 1915). Nach einer zunächst mehr summarischen Erfassung führten ausgedehnte Untersuchungen zu der Erkenntnis, daß es sich beim Abbau der Pektine um einen komplex mehr oder weniger voneinander abhängiger Einzelprozesse handelt, von denen jeder nur unter Mitwirkung relativ substratspezifischer Enzyme verläuft.

Im einzelnen kann man heute drei Gruppen von hierbei beteiligten pektischen Enzymen unterscheiden:

1. Pektinmethylesterasen (PME). Entsprechend ihrer Wirkungsweise, nämlich der Überführung hochveresterter Pektine in niedrigveresterte bis zu den Pektinsäuren durch Spaltung der Esterbindungen und Freisetzung von Methanol, werden sie auch als Pektinmethoxylasen bezeichnet.
2. Polygalakturonasen (PG, Poly- α -1,4-galakturonid-glykanhydrolasen). Hinsichtlich ihrer Substratspezifität ist nach BATEMAN und MILLAR (1966) zu unterscheiden zwischen Polygalakturonasen im engeren Sinne, welche bevorzugt Pektinsäure abbauen - beim Abbau von verestertem Pektin sind sie auf die Mitwirkung der PME angewiesen - und solchen, welche in erster Linie veresterte Pektine abbauen und daher als Polymethylgalakturonasen bezeichnet werden. Der Abbau erfolgt bei beiden durch hydrolytische Spaltung der α -1,4-glykosidischen Bindungen der Galakturonsäurereste und führt somit zu einer fortschreitenden Verkürzung der Molekülketten. Je nachdem, ob die Enzyme das Substratmolekül an beliebigen Stellen oder nur von den Kettenenden her angreifen, unterscheidet man zwischen Endo- und Exo-Polygalakturonasen.
3. Pektin-transeliminassen (PTE; Poly- α -1,4-D-galakturonid-lyase). Auch hier ist nach BATEMAN und MILLAR (1966) zu unterscheiden zwischen in erster Linie Pektinsäure hydrolysierenden (Polygalakturon-transeliminassen) und solchen, welche veresterte Pektine bevorzugt abbauen (Pektinmethyl-transeliminassen). Die Unterscheidung in Endo- und Exo-Enzyme erfolgt wie bei den Polygalakturonasen.

Auch bei der Hydrolyse der Zellulose ist, wie bei deren komplexem Aufbau nicht anders zu erwarten, nicht nur ein einzelnes Enzym beteiligt. REESE et al. (1950) haben gezeigt, daß eine große Anzahl von Mikroorganismen befähigt ist, durch Vorbehandlung mit NaOH oder anderen Agenzien modifizierte Zellulose zu hydrolysieren, daß jedoch nur wenige von ihnen zum Abbau nativer Baumwollzellulose in der Lage sind. Auf Grund dieser und ähnlicher Befunde bei anderen Autoren wird von ihnen das Zusammenwirken von mindestens zwei verschiedenen Zellulasen angenommen, die als C_1 - und C_x -Enzyme bezeichnet werden. Das C_1 -Enzym soll die native Zellulose zu linearen Anhydroglukoseketten spalten, welche sodann durch das C_x -Enzym nach Lysis der 1,4-glykosidischen Bindungen zu löslichen niedermolekularen Produkten, wie Cellobiose und Glukose, weiter hydrolysiert werden.

Bedeutung pektischer und zellulolytischer Enzyme für die Pathogenese

Wie eingangs bereits erwähnt, scheint die Mitwirkung vom Erreger ausgeschiedener pektischer und zellulolytischer Enzyme auf Grund der Struktur des pflanzlichen Gewebes im Krankheitsverlauf unerläßlich zu sein. Hinsichtlich der Frage der Bedeutung dieser lytischen Prozesse für die Pathogenese wurden in Untersuchungen der letzten Jahre jedoch recht unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Dies gilt insbesondere auch für Rhizoctonia solani Kühn, der als Erreger der Wurzelkötterkrankheit der Kartoffel sowie von Keimlingskrankheiten bei zahlreichen Pflanzen weit verbreitet ist. Weder aus den Befunden von HADLEY und PEROMBELON (1963) noch aus denen von PAPAIVIZAS und AYERS (1965) kann auf eine Beziehung zwischen der Aktivität der pektischen Enzyme in vitro und der Pathogenität geschlossen werden. Eine sehr deutliche Übereinstimmung zwischen der PG-Aktivität in vitro und der Pathogenität fanden jedoch BARKER und WALKER (1962). Dagegen zeigte sich zwischen der PME-Aktivität und der Pathogenität keine posi-

tive Korrelation. Auch die Ergebnisse einer ganzen Reihe von Untersuchungen von BATEMAN und Mitarbeitern (1963a, 1963b, 1963c, 1964a, 1964b, 1965, 1964/65, 1965, 1966) über die pektolytische und zellulolytische Aktivität von Rhizoctonia solani, die unter den verschiedensten Gesichtspunkten durchgeführt wurden, lassen im Prinzip auf eine wichtige Rolle der Pektinasen bei der Pathogenese schließen. Der Zellulase ist diesen Untersuchungen zufolge keine größere Bedeutung für das Zustandekommen und den Verlauf der Krankheit beizumessen; hingegen scheint sie für die saprophytische Entwicklung des Pilzes im abgetöteten Gewebe wichtig zu sein (BATEMAN 1964b).

Inwieweit ein Vergleich der in vitro produzierten Enzyme pathogener und nichtpathogener Organismen als beweiskräftig angesehen werden kann, sei hier nicht näher diskutiert. Soweit die Versuche in vitro mit ungepufferten Nährmedien durchgeführt wurden, ergeben sich jedoch folgende Bedenken: Es ist bekannt, daß die Synthese eines bestimmten Enzyms nur in einem begrenzten pH-Bereich optimal verläuft, beispielsweise PG bei Rhizoctonia solani um pH 4,0 (BARKER und WALKER 1962), während bei einem höheren pH-Wert die Synthese von PTE (SHERWOOD 1964) und bei pH 7,0 die von PME (BARKER und WALKER 1962) vorstatten geht. Für die Menge der in das Nährmedium ausgeschiedenen PG dürfte also der Zeitraum, innerhalb dessen das Nährmedium den für die Bildung optimalen pH-Wert aufweist, entscheidend sein. Die pH-Werte der gebräuchlichsten Nährlösungen ändern sich unter dem Einfluß des Organismus jedoch relativ schnell. In Untersuchungen von ISRAEL und SHAH ALI (1964) mit Rhizoctonia solani in einem ungepufferten Medium stieg der Anfangs-pH-Wert von 5,2 unter dem Einfluß des Organismus innerhalb von 3 - 4 Tagen auf über pH 7,0 und erreichte ein Maximum um pH 8,0 etwa am 8. Tag. SHERWOOD (1966) stellte, ebenfalls bei Rhizoctonia solani, die gleichen pH-Veränderungen fest. PANDEY und GUPTA (1966) untersuchten die Synthese pektischer Enzyme von Alternaria tenuis auf verschiedenen synthetischen Nährmedien. Auch

hier ergab sich ein schneller Anstieg des pH-Wertes des Mediums von 3,4 auf 8,0, bzw. von 4,6 auf 8,4. MENKE (unveröffentlicht) fand pH-Wert-Veränderungen der Nährlösung von 3,8 auf pH 7,8 innerhalb von 10 Tagen bei Fusarium oxysporum f. lycopersici. NOUR EL DEIN und SHARKAS (1963) fanden in ihren Untersuchungen über den zeitlichen Ablauf der PG-Synthese bei Rhizoctonia solani, daß bis zum 7. Tag eine kontinuierliche Zunahme, nach dem 7. und 8. Tag bis zum 9. und 10. Tag jedoch ein schlagartiger Abfall auf etwa 1/15 der Aktivität zu verzeichnen ist. In Untersuchungen SHERWOODs (1966) war das Maximum der Enzymaktivität schon nach 5 Tagen erreicht; bis zum 9. Tag sank sie sehr stark ab. Vergleicht man die Befunde der verschiedenen Autoren miteinander, so kann man schließen, daß zwar außerhalb des pH-Optimums eine weitere Enzymsynthese stattfindet, mit Erreichung eines bestimmten pH-Bereiches jedoch das gebildete Enzym wieder degradiert wird. Hieraus ergeben sich für vergleichende enzymologische Untersuchungen an pathogenen und nichtpathogenen Organismen Konsequenzen, welche berücksichtigt werden sollten:

1. Zu einem bestimmten Meßzeitpunkt kann theoretisch der weniger pathogene Organismus das zeitliche Maximum der Enzymbildung gerade erreicht haben, der stärker pathogene hingegen hat, evtl. auf Grund seines aktiveren Stoffwechsels, dieses bereits deutlich überschritten und erweist sich daher scheinbar als der schlechtere Enzymbildner.
2. Es ist nicht auszuschließen, daß von zwei zu vergleichenden Organismen der eine bestimmte Stoffwechselprodukte stärker ausscheidet als der andere und damit den pH-Wert des Mediums rascher verändert. Infolgedessen verläßt er den Optimumbereich früher und erreicht, obwohl er in vivo durch die puffernde Wirkung des Pflanzengewebes zu gleicher Enzymsynthese befähigt ist, in vitro niedrigere Werte als der andere.

Es erscheint daher von Interesse, den Verlauf der Enzymbildung (PG und C_x) in einem gepufferten Nährmedium unter verschiedenen Gesichtspunkten näher zu untersuchen. Von besonderer Wichtigkeit ist dabei die Frage, ob in einem solchen Medium die Inaktivierung einer einmal gebildeten PG- oder C_x -Menge über einen längeren Zeitraum verhindert werden kann, was aus den geschilderten Gründen Vergleiche wesentlich erleichtern würde.

Eine andere Möglichkeit zum Studium der Rolle pektischer und zellulolytischer Enzyme in der Pathogenese, hat GROSSMANN (1962 a, b, c, d, 1964) aufgezeigt. In umfangreichen Untersuchungen testete er eine größere Anzahl von Substanzen auf ihre Hemmwirkung gegenüber pektischen Enzymen von Fusarium oxysporum f. lycopersici und Alternaria solani in vitro und stellte fest, wie die gefundenen Inhibitoren bei Verabreichung an Tomatenpflanzen deren Befall durch Fusarium oxysporum f. lycopersici beeinflussen. Zumindest bei einem von drei in vitro wirksamen Inhibitoren ergab sich eine ausgeprägte, gesicherte Befallsminderung. Wenn damit auch noch kein direkter Beweis dafür erbracht wurde, daß diese auf der Blockierung der pektischen Enzyme des Parasiten beruht, so läßt doch die gute Übereinstimmung der in vitro erzielten Ergebnisse einen derartigen Zusammenhang als wahrscheinlich erscheinen.

Über Hemmstoffversuche an pektischen oder zellulolytischen Enzymen in vitro ist in den letzten Jahren von zahlreichen Autoren berichtet worden. Über den Einfluß solcher Hemmstoffe auf die Pathogenese finden sich jedoch außer den zitierten Arbeiten von GROSSMANN keine weiteren Hinweise.

In der vorliegenden Arbeit soll nun das Wachstum und die Enzymsynthese von Rhizoctonia solani in einem gepufferten Medium sowie die Wirkung einer Reihe von Substanzen auf die Aktivität dieser Enzyme in vitro untersucht werden. Da sich der Pilz vorwiegend unter Auflösung der Pektine und der Zellulose in den Zellwänden im Pflanzengewebe

ausbreitet (RICHTER und SCHNEIDER 1953, CHRISTOU 1962), soll weiterhin untersucht werden, wie die in vitro wirksamen Inhibitoren nach Applikation in das Gewebe den Krankheitsverlauf beeinflussen.

B. UNTERSUCHUNGEN IN VITRO

=====

I. Material und Methoden

=====

1. Verwendete Pilzstämme:⁺⁾

Von zunächst insgesamt 10 in Vorversuchen auf ihre Eignung getesteten Pilzstämmen wurden folgende 3 für die weiteren Versuche ausgewählt:

- a) Rhizoctonia solani Kühn, Stamm C 7. Isolierung von Kalanchoe (vgl. RICHTER und SCHNEIDER 1953).
- b) Rhizoctonia solani, Stamm D 5. Isolierung von Brassica oleracea var. botrytis (vgl. RICHTER und SCHNEIDER 1953).
- c) Rhizoctonia solani Kühn, Stamm R-B. Isolierung von Phaseolus vulgaris (vgl. BATEMAN 1963c).

Zu vergleichenden Untersuchungen über die Bildung pektischer und zellulolytischer Enzyme wurden zunächst alle drei Stämme herangezogen, während für die weiteren Versuche in vitro nur noch der zuletzt genannte Stamm verwendet wurde.

Die Pilze wurden anfangs auf Malz-Agar (MA), später auf Kartoffel-Dextrose-Agar (KDA) oder Bohnen-Malz-Agar (BMA) kultiviert. Zur Herstellung des letzteren wurden 250 g Bohnenkeimlinge zerkleinert und 20 Minuten in einem Liter Leitungswasser gekocht. Die Lösung wurde durch Watte filtriert und mit Leitungswasser wieder auf 1 Liter aufgefüllt. In dieser Menge wurden 20 g Biomalz und 20 g Agar gelöst.

2. Herstellung der Enzympräparate. Zur Herstellung der Enzympräparate diente in allen Fällen ein Medium mit folgender Grundnährlösung (nach GROSSMANN 1962b):

⁺⁾ Für die Überlassung der Stämme sind wir dem Institut für Mykologie der Biol. Bundesanstalt (Leiter: WOR Dr. W. Gerlach) sowie Herrn Prof. Dr. F. Bateman, Dept. of Plant Pathology, Cornell University, Ithaka, New York, zu großem Dank verpflichtet.

$0,1 \text{ \% } \text{NH}_4\text{NO}_3$
 $0,05 \text{ \% } \text{Mg SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ } gelöst in 0,2 M Phosphatpuffer

Als C-Quelle wurden dieser Lösung, je nach der Fragestellung des Versuches, entweder ein hochgereinigtes Apfelpektin der Firma Schuchardt, München, Carboxymethylzellulose (Tylose 600) der Firma Serva, Heidelberg, oder Glukose beigegeben. Sofern die Bildung der PG und der Zellulase (C_x) unter möglichst gleichen Bedingungen getestet werden sollte, erfolgte eine Zugabe sowohl von Pektin als auch von Carboxymethylzellulose (CMC) in gleichen Anteilen. Die Nährlösungen wurden in der Regel zu jeweils 40 ml in 100 ml Erlenmeyer-Kölbchen abgefüllt, bei 130°C autoklaviert und mit 2 - 4 Tagen altem Myzel beimpft. Ihr pH-Wert lag je nach Zweck des Versuches zwischen pH 4,3 und pH 5,4. Jede Variante umfaßte 6 Wiederholungen. Die Inkubationsdauer betrug in der Regel mindestens 14 Tage bei einer Temperatur von 27°C . Danach wurden die Myzelmaten durch Filtrieren abgetrennt. Die Kulturfiltrate wurden dann für 20 Min. bei 6000 Umdr./Min. zentrifugiert und, außer für die Hemmstoffuntersuchungen, sofort als Enzympräparate verwendet.

Um ein möglichst einheitliches Enzymmaterial für die Versuche zur Enzymhemmung zu erhalten, wurde eine größere Menge Nährlösung mit 1 % Pektin oder 1 % CMC als C-Quelle zu je 900 ml in Penicillinkolben eingefüllt, autoklaviert, beimpft und wie oben angegeben inkubiert. Das hieraus erhaltene Kulturfiltrat wurde im Rotationsverdampfer auf etwa $1/7$ eingeeengt, zentrifugiert und in der Kälte mit der doppelten Volumenmenge an Azeton versetzt. Der sich bildende Niederschlag wurde abfiltriert, über P_2O_5 im Vakuum getrocknet und als "trockenenzym" verwendet.

3. Herstellung der Substrate. Als Substrat für die PG-Untersuchungen diente Pektinsäure (Fluka AG, Buchs, Schweiz). In einer Konzentration von 1,5 % wurde sie - gemeinsam mit der gleichen Menge Ammoniumoxalat, um die Bildung unlöslicher Ca-Pektate zu verhindern - einer 0,15 molaren Zitrat-

Phosphat-Pufferlösung zugesetzt und mit einem Ultra Turrax-Gerät (24000 Umdr./Min.) in Lösung gebracht. (hinsichtlich des Einflusses verschiedener Puffer auf die PG-Aktivität vgl. MAYER et al. 1964).

Zur Herstellung eines Substrates für die C_x -Untersuchungen wurde 0,75 % CMC in Zitrat-Phosphat-Pufferlösung bei einer Temperatur von 70 - 80° C mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst.

4. Messung der Enzymaktivität. Für diese Untersuchungen wurde das Brookfield-Rotations-Viskosimeter Typ LVF bei 60 Umdr./Min. verwendet (vgl. SHERWOOD und KELMAN 1964 sowie DURBIN und HUPPLER 1965). Zur Feststellung der PG-Aktivität wurden Enzymlösung und Substrat auf pH 4,9, zur Feststellung der C_x -Aktivität auf pH 5,0 eingestellt. Anschließend wurden 12,5 ml der unmittelbar vor der Messung auf 30° C erwärmten Substratlösung mit 12,5 ml der ebenfalls auf 30° C vorgewärmten Kulturfiltrate in die Adapterhülse des Meßgerätes zusammengegeben. Die Temperatur dieses Reaktionsgemisches betrug auch während der Messung stets $30 \pm 0,1^\circ$ C. Die Ablesung der Viskositätswerte erfolgte erstmals nach 1 Minute, dann in Abständen von 3 Minuten. Die Messungen wurden in der Regel solange fortgeführt, bis die Ausgangsviskosität auf die Hälfte abgesunken war. Als Ausgangswert wurde die Viskosität eines Reaktionsgemisches mit inaktiviertem Enzym zu Grunde gelegt. Als theoretischer Endwert galt die Viskosität 1,0 cP, was etwa der einer vollständig zu Glukose abgebauten Zelluloselösung bzw. einer vollständig zu Galakturonsäure abgebauten Pektinsäurelösung entspricht. Somit errechnet sich der 50 %ige Viskositätsverlust nach der Formel $\frac{VA - 1,0}{2}$, wobei VA die Ausgangsviskosität (in cP) darstellt.

Das zuletzt beschriebene Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität ist das gebräuchteste. Als Maß der Aktivität gelten die RA-Einheiten (RA = relative Aktivität) pro g oder ml Enzym, die sich nach BATEMAN (1963a) aus der Formel $RA = \frac{1}{t} \times 1000$ errechnen; t ist hierbei die für einen

50 %igen Verlust der Ausgangsviskosität erforderliche Zeit in Minuten.

5. Versuche zur hemmung von C_x und PG. Zur Durchführung der Hemmstoffversuche wurde "Trockenenzym" 0,6 %ig (C_x) und 0,7 %ig (PG) in dest. Wasser gelöst. Jeweils 5 ml dieser Enzymlösung wurden mit 7,5 ml der entsprechend konzentrierten und auf pH 5,0 zur C_x- bzw. auf pH 4,9 zur PG-Bestimmung eingestellten Hemmstofflösung im Reagenzglas zusammengegeben und durch Schütteln mit einem "Whirlmix-Gerät" mit dieser vermischt. Da GROSSMANN (1962b) gezeigt hat, daß die Hemmwirkung mancher Substanzen sehr wesentlich von der Dauer ihrer Einwirkung auf das Enzym abhängt, wurde das Enzym-Hemmstoffgemisch erst nach einer Präinkubationszeit von mindestens 6 Stunden mit 12,5 ml des Substrates zusammengegeben und der Viskositätsverlust unter den gleichen Bedingungen (30° C) und auf die gleiche Weise wie bereits beschrieben gemessen. Jeder Ansatz enthielt gleichzeitig Kontrollen ohne Hemmstoff (dest. Wasser anstelle der Hemmstofflösungen) und solche, die durch Autoklavieren bei 130° C inaktiviertes Enzym enthielten. Das Ausmaß der durch die verschiedenen Substanzen erzielten Hemmung des Substratabbaus wurde immer für den Zeitpunkt ermittelt, zu dem in der Kontrollprobe ohne Hemmstoffzusatz ein 50 %iger Verlust der Ausgangsviskosität erreicht worden war. Die prozentuale Hemmung durch einen Inhibitor errechnet sich sodann nach folgender, von GROSSMANN (1967) verwendeten Formel:

$$I = \frac{(L_K - L_H) \times 100}{L_K}$$

(L_K = Viskositätsverlust in der Kontrolle, wenn Ausgangsviskosität zu 50 % abgebaut

L_H = zur selben Zeit unter Hemmstoff-Zusatz erreichter Viskositätsverlust).

6. Versuche zur PME-Hemmung. Die Herstellung der Enzymlösung erfolgte in Anlehnung an BATEMAN (1963c). 7 Tage alte Bohnenkeimlinge der Sorte "Goldurzel" wurden unter scharfem Wasserstrahl gesäubert, im Starmix zerkleinert, zu je 225 g in 900 ml Leitungswasser in Penicillinkolben eingefüllt, durch Autoklavieren bei 130° C sterilisiert, mit je zwei myzelbewachsenen Agarstückchen (Ø 18 mm) beimpft und bei 27° C inkubiert. Der pH-Wert des sterilisierten Materials war 6,1. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurde das Myzel samt den Resten des Pflanzengewebes durch einige Mull-Lagen abfiltriert, das Filtrat zweimal für 20 Minuten bei 6000 Umdr./Min. zentrifugiert und bis zur Verwendung als Enzympräparat eingefroren. Eine Dialyse der Lösung oder Zugabe von NaCl wurde nicht vorgenommen, da hierdurch nach BATEMAN (1963c) die Aktivität des unter diesen Bedingungen gewonnenen Enzyms nicht positiv beeinflusst wird.

Als Substrat für die PME-Messung diente eine 2,6 %ige Pektinlösung in dest. Wasser, die ebenso wie die Enzym- und Hemmstofflösungen nach Erwärmung auf 30° C auf genau pH 7,0 eingestellt wurde. Je 10 ml der entsprechend überkonzentrierten Hemmstofflösungen konnten vor der Messung für mindestens vier Stunden bei Zimmertemperatur auf 15 ml Enzymlösung einwirken. Zur Kontrolle wurde die gleiche Enzymmenge mit 10 ml dest. Wasser anstelle eines Hemmstoffs inkubiert.

Um bakterielle Verunreinigungen soweit wie möglich zu verhindern, wurden sowohl in die Enzymlösung als auch in das Substrat einige Tropfen Toluol gegeben. Die Aktivität der PME wurde in Anlehnung an KERTESZ (1955) auf folgende Weise gemessen: 15 ml Pektinlösung und 25 ml des Enzym-Hemmstoffgemisches wurden in einem 100 ml-Becherglas zusammengegeben und mit einem Magnetrührer kontinuierlich durchmischt. Parallel zu den aktiven Enzymproben wurde durch Autoklavieren bei 130° C inaktiviertes Enzym auf die gleiche Weise vorbehandelt und gemessen. Die pH-Messungen wurden mit einer Glaselektrode vorgenommen. Die Meßzeit

betrug 30 Min. bei genau 30° C. Die infolge der enzymatischen Demethoxylierung des Pektins eintretende Säurebildung wurde durch fortlaufende Titration mit 0,01 n NaOH ausgeglichen und der pH-Wert somit ständig auf 7,0 gehalten. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde der pH-Wert durch schnelle Zugabe von NaOH sofort auf 7,5 erhöht (Äquivalenzpunkt des Pektins) und der gesamte Verbrauch an Lauge bestimmt. Nach Abzug der in dem Substratgemisch mit inaktivierten Enzym verbrauchten Lauge ergibt die verbleibende Menge das Maß für die Enzymaktivität. Als Maß für die Hemmwirkung gilt die Differenz im NaOH-Verbrauch des Reaktionsgemisches in Anwesenheit eines bestimmten Inhibitors im Vergleich zu der mit dest. Wasser behandelten Kontrolle.

7. Fungitoxizitätstest. Substanzen, die sich als wirksame Hemmstoffe für PG und C_x erwiesen hatten, wurden auf folgende Weise auf ihre Fungitoxizität getestet:

2,25 %ige Agarlösung, mit 1,5 % Glukose als C-Quelle, wurde im Verhältnis 2:1 mit dem dreifach überkonzentrierten und auf pH 6,0 eingestellten Hemmstoff bei etwa 60° C vermischt und zu je 10 ml in jeweils 6 Petrischalen pro Variante ausgegossen. Die Kontrollen enthielten statt Hemmstoff dest. Wasser. Die Schalen wurden mit myzelbewachsenen Agarscheibchen (Ø 5,5 mm) aus der Randzone zwei bis vier Tage alter Kulturen beimpft und bei 27° C inkubiert. Als Maß für die Fungitoxizität diente die Differenz im Myzelzuwachs der mit Hemmstoffen behandelten Proben gegenüber den Kontrollproben, radial gemessen nach 48 Std..

II. Ergebnisse

=====

1. PG- und C_x -Aktivität verschiedener Pilzstämmen in einem gepufferten Nährmedium

Die Versuchsdauer betrug 13 Tage. Die Enzymaktivität lag zu diesem Zeitpunkt derart hoch, daß zur Messung der PG-Aktivität eine vorherige Verdünnung des Kulturfiltrates mit dest. Wasser im Verhältnis 1 : 30, zur Messung der C_x -Aktivität eine solche im Verhältnis 1 : 10 erforderlich war. Es zeigte sich, daß hinsichtlich der Aktivität sowohl der PG als auch der Zellulase zwischen den drei für die Versuche in vivo vorgesehenen Pilzstämmen zwar keine prinzipiellen, jedoch erhebliche graduelle Unterschiede bestehen (Tab. 1). Die höchste PG-Aktivität weist das Kulturfiltrat des Stammes D 5 auf, etwa 9 - 10 mal soviel wie das des Stammes C 7 mit der geringsten Aktivität. Die Aktivität des Filtrates des Stammes R-B liegt etwa in der Mitte zwischen den beiden erstgenannten.

Tabelle 1: PG- und C_x -Aktivität 3 verschiedener Stämme von Rhizoctonia solani

Stamm	PG-Aktivität		C_x -Aktivität	
	50 % Abbau Min.	RA-Einh. pro ml	50 % Abbau Min.	RA-Einh. pro ml
D 5	4,20	571,4	4,00	200,0
R-B	10,66	224,9	4,80	166,6
C 7	40,00	59,9	13,25	60,3

Hinsichtlich der C_x -Aktivität besteht für die 3 Stämme die gleiche Rangfolge, jedoch sind die Unterschiede weniger deutlich ausgeprägt.

Besondere Erwähnung verdient vor allem die deutlich geringere Enzymaktivität des Stammes C 7 gegenüber der des Stammes R-B. Ein Wiederholungsversuch ergab die gleiche Reihenfolge.

2. Wachstum und enzymatische Aktivität (C_x und PG) des Stammes R-B

a) Zeitlicher Verlauf der Enzymsynthese, des Myzelwachstums und der pH-Wert-Veränderung der Nährlösung

Zweck des Versuches war es in erster Linie, das zeitliche Maximum der Enzymaktivität in einem gepufferten Medium zu ermitteln. Weiterhin sollte ein Einblick in die Myzelbildung und die pH-Wert-Veränderung über einen längeren Zeitraum gewonnen werden. Die Versuchsdauer betrug 23 Tage. Teile der Nährlösung waren bei Versuchsbeginn sowie in Abständen von 6, 10, 13, 16 und 20 Tagen beimpft worden. Da dem Medium sowohl Zellulose als auch Pektin beigegeben worden war, konnte das Kulturfiltrat gleichzeitig auf PG- und C_x -Aktivität getestet werden.

Die Aktivität beider Enzyme war derart hoch, daß vorher eine Verdünnung mit dest. Wasser (Verh. 1:14) erforderlich war. Die Werte der Abbildung 1 täuschen insofern etwas, als aus ihnen infolge der Verdünnung für den Zeitpunkt 3 Tage nach der Beimpfung nur eine sehr geringe Aktivität hervorzugehen scheint. Das Maximum der Enzymsynthese wird für beide Enzyme am 13. Tag erreicht. Die zu diesem Zeitpunkt erreichte C_x -Aktivität sinkt zwar bis zum 17. Tag deutlich ab, bleibt aber dann bis zum Versuchsende relativ konstant. Die PG-Aktivität verändert sich demgegenüber nach Erreichung des Maximums nur unwesentlich.

Die Myzelgewichte steigen bis zum 10. Tag, während des leichten pH-Wert-Rückgangs, kontinuierlich an. Vom 10. zum 13. Tag ist nur noch eine sehr geringe Myzelbildung zu beobachten; bis zum 23. Tag ist, außer einer geringfügigen Verringerung zwischen dem 13. und 17. Tag, keine wesentliche Veränderung der Myzelgewichte mehr festzustellen (Abb. 1).

Der pH-Wert sinkt zunächst bis zum 7. Tag etwas ab. Er steigt dann bis zum 13. Tag nur geringfügig über den Ausgangswert an und bleibt anschließend relativ konstant bis

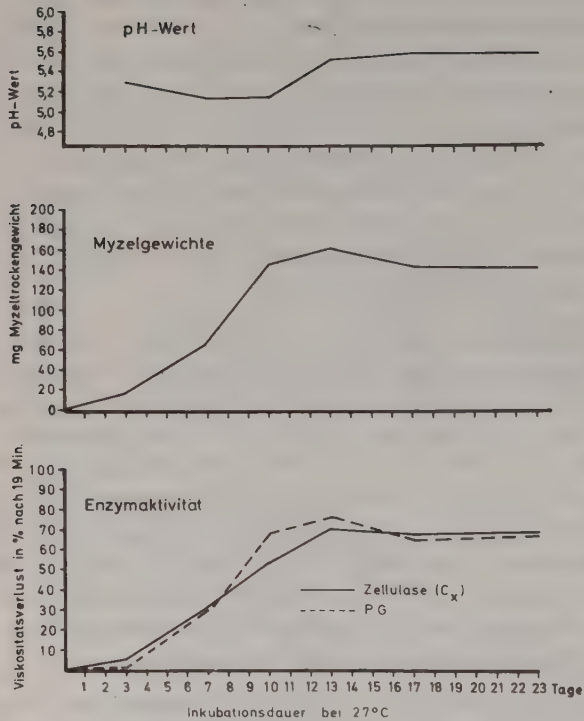


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der pH-Wert-Veränderung des Nährmediums, der Myzelbildung und der Enzymsynthese durch den Stamm R-B.

zum Versuchsende (vgl. Abb. 1). Wie zu beobachtenden leichten Veränderungen fallen, wie ein Vergleich mit den Werten des Versuches über den zeitlichen Verlauf der Enzymsynthese zeigt, in den Abschnitt der stärksten enzymatischen Aktivität des Pilzes. Allgemein kann jedoch festgestellt werden, daß der verwendete 0,2 M Phosphatpuffer stärkere pH-Schwankungen, vor allem das in ungepufferten Medien häufig beobachtete kontinuierliche Ansteigen desselben, weitgehend verhindert.

b) Vergleich der Wirkung verschiedener C-Quellen auf das Myzelwachstum sowie die PG- und C_x-Aktivität des Pilzes

Auf Grund der Ergebnisse des vorhergehenden Versuches über das zeitliche Optimum der PG- und C_x-Bildung betrug die Inkubationsdauer in diesem Versuch 14 Tage. Dem Pilz wurden Glukose, Pektin und Zellulose (CMC) sowohl jeweils allein als auch miteinander kombiniert als C-Quelle in der Nährlösung verabreicht. Im einzelnen ergaben sich somit folgende Varianten:

1) Glukose	1	%
2) Pektin	1	%
3) Zellulose	1	%
4) Glukose + Pektin }	je	0,5 %
5) Glukose + Zellulose }	je	0,5 %
6) Pektin + Zellulose }	je	0,5 %
7) Glukose + Pektin + Zellulose }	je	0,33 %

Aus Abbildung 2 ist zu ersehen, welches Myzeltrockengewicht und welche PG- und C_x-Aktivität bei Verabreichung der jeweiligen Nährstoffe von dem Pilz gebildet wurden. Dabei zeigt sich, daß Myzelbildung und Enzymsynthese völlig unabhängig voneinander verlaufen.

Die bei weitem höchsten Myzeltrockengewichte aller Varianten bildet der Pilz auf Glukose. Wenn auch die Enzymaktivi-

tät auf diesem Medium durch das Fehlen von Pektin und CMC als Induktoren nur sehr gering ist, so ist sie doch deutlich nachweisbar. Mit dem sinkenden Anteil der Glukose in den übrigen Nährstoffkombinationen sinken im allgemeinen auch die Myzelgewichte.

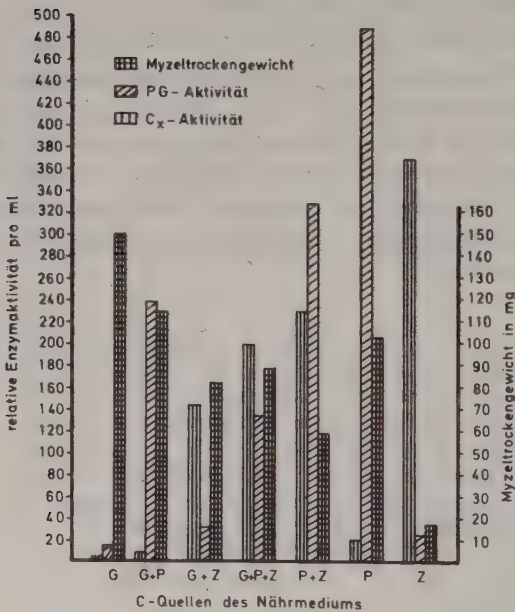


Abb. 2: Myzelgewichte, PG- und C_x-Aktivität von Kulturfiltraten mit unterschiedlichen C-Quellen als Nährsubstrat (G = Glukose; P = Pektin, Z = Carboxymethylzellulose. Einzelheiten im Text!)

Die Zugabe von Pektin oder von Zellulose in das Nährmedium, allein oder mit Glukose gemeinsam, fördert zunächst das für die zugegebene Substanz spezifische Enzym, gleichzeitig wird jedoch auch eine verstärkte Synthese des anderen hierdurch induziert. Möglicherweise sind es Spuren pektischer Substanzen in Zellulose oder Zelluloseanteile in dem verwendeten Pektin, die hierfür verantwortlich sind.

Besonders groß ist der Unterschied zwischen Myzelbildung und Enzymaktivität bei alleiniger Verabreichung von Zellulose im Nährsubstrat. Niedrigstes Myzelgewicht und höchste C_x -Aktivität aller verwendeten Kombinationen sind auf dieser C-Quelle zu beobachten. Die Enzymaktivität sinkt jedoch beträchtlich ab, wenn der Anteil der Zellulose um die Hälfte vermindert und dafür der gleiche Gewichtsanteil an Glukose gegeben wird. Zu einer ähnlich drastischen Abnahme der Aktivität kommt es bei der PG, sofern statt Pektin allein Glukose gemeinsam mit Pektin in gleichen Gewichtsanteilen dem Pilz als C-Quelle zur Verfügung steht.

Die Kombination gewichtsmäßig gleich hoher Anteile von Pektin und Zellulose in der Nährlösung bewirkt zwar keine sehr gute Myzelbildung, die Aktivität sowohl der PG als auch der Zellulase erreicht jedoch unter diesen Bedingungen eine beachtliche Höhe. Sie empfiehlt sich vor allem dann, wenn die Bildung beider Enzyme unter gleichen Bedingungen getestet werden soll.

c) Wirkung unterschiedlicher Vorkultur des Inokulums auf Myzelwachstum, PG- und C_x -Synthese

Bereits in Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß auf Malz-Agar angezogenes Inokulum ein wesentlich schlechteres Myzelwachstum auf flüssigen Nährmedien ergibt als solches, welches für einige Tage auf Bohnen-Malz-Agar angezogen worden war. Es war anzunehmen, daß eine vorherige Adaption an pektisches Material und Zellulose die Fähigkeit zum späteren Aufschließen dieser Substanzen in der Nährlösung

begünstigt. Auf Malz-Agar (MA) gewachsenes Myzel wurde daher zum Vergleich auch auf Pektin-Zellulose-Agar (PZA), Kartoffel-Dextrose-Agar (KDA) und Bohnen-Malz-Agar (BMA) geimpft und für etwa drei Wochen weiter kultiviert. Auf BMA zeigte der Pilz das beste Wachstum. Etwas weniger gut wuchs er auf KDA und MA, hingegen war auf PZA nur eine sehr dünne und spärliche Myzelausbreitung zu beobachten (Abb. 3).

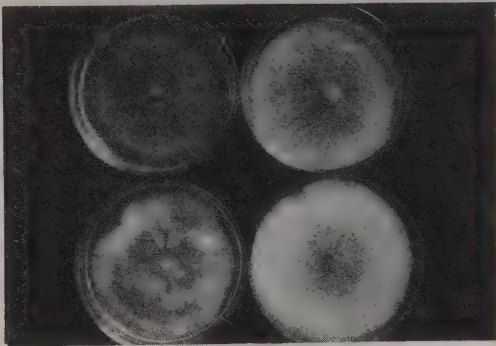


Abb. 3: Wachstum des Stammes R-B von *Rhizoctonia solani* auf vier verschiedenen Nährböden (von links oben nach rechts unten: PZA, MA, KDA, BMA; vgl. Text)

Nach Inokulation einer Nährlösung, die 1 % Pektin und 1 % Zellulose als C-Quellen enthielt, mit Myzel von diesen vier verschiedenen Nährböden war nach 7 Tagen folgende Myzelausbreitung in den einzelnen Varianten zu beobachten:

<u>Inokulum von</u>	<u>Myzelausbreitung</u>
Pektin-Zellulose-Agar (PZA)	kein Myzel
Malzagar (MA)	kleinere Myzelflecke
Kartoffel-Dextrose-Agar (KDA)	lockere, geschlossene Myzeldecke
Bohnen-Malz-Agar (BMA)	dichte, geschlossene Myzeldecke

Die nach Versuchsabschluß abfiltrierten und zunächst bis zur Verarbeitung eingefrorenen Proben ergaben bei der Messung der enzymatischen Aktivität Werte, welche in diesem Fall mit der beobachteten Myzelentwicklung vollkommen parallel gehen. Eine Verbesserung der pektischen und zellulolytischen Fähigkeit des Pilzes ist durch seine Vorkultur auf Pektin und Zellulose offenbar nicht erreicht worden (Abb. 4). Hingegen zeigt sich eine deutliche Überlegenheit bei den Proben, deren Inokulum auf Grund der schnelleren Myzelausbreitung auf dem Agar eine allgemein größere Stoffwechselaktivität vermuten ließ.

Inwieweit das auf PZA zu beobachtende langsamere Wachstum des Inokulums auf Festlegung der beiden C-Quellen durch das Agar zurückzuführen ist, wäre zu überprüfen.

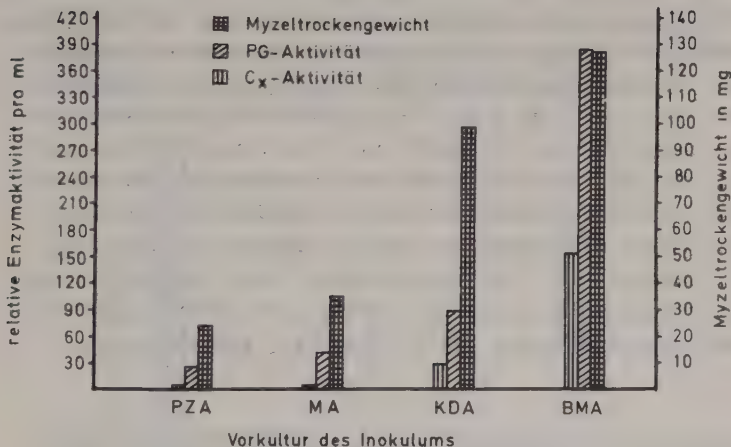


Abb. 4: Einfluß der Vorkultur des Inokulums auf Myzelgewichte und Enzymaktivität der Kulturfiltrate 9 Tage nach der Beimpfung.

3. Versuche mit Hemmstoffen

a) Enzymkonzentration und Hemmeffekt

Wie bereits eingangs erwähnt, wurde in allen Hemmstoffversuchen die Messung dann beendet, wenn in der hemmstofffreien Kontrollprobe die Viskosität auf 50 % des ursprünglichen Wertes abgesunken war.

Die Zeit bis zur Erreichung dieses 50 %-Wertes und damit die Versuchsdauer kann also je nach der gewählten Enzymkonzentration länger oder kürzer bemessen werden.

In diesem Zusammenhang erhebt sich jedoch die Frage, wie sich die Veränderung der Enzymkonzentration bei gleichbleibender Konzentration des Hemmstoffs auf den Grad der Hemmung auswirkt. Kann man beispielsweise die Zeit bis zur Erreichung des 50 %igen Viskositätsverlustes beliebig verkürzen oder wird infolge der hierzu notwendigen Erhöhung der Enzymkonzentration der prozentuale Hemmeffekt größer bzw. kleiner? Zur Klärung dieser für die geplanten Hemmstoffversuche interessierenden Frage wurde zunächst aus "Trockenenzym" eine 6 %ige Enzymlösung hergestellt und diese auf 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % und 0,125 % verdünnt. Als Hemmstoff diente Tannin in einer Konzentration von 100 ppm. Als Substrat wurde eine Carboxymethylzellulose in Zitrat-Phosphatpufferlösung verwendet. Der pH-Wert des Hemmstoffs ebenso wie der der CMC-Lösung wurde auf 5,0 eingestellt. Der Versuch wurde 3 mal wiederholt; bei jeder Wiederholung wurden jeweils 2 Parallelen gemessen. Das Versuchsergebnis ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Prozentuale Hemmung unterschiedlicher Enzymkonzentrationen (C_x) durch Tannin (100 ppm)

Enzymkonz. in %	50 % Viskositäts- verlust nach	Hemmung in %
6,000	1,42 Min.	47,9
4,000	1,98 "	39,9
2,000	3,93 "	26,2
1,000	7,10 "	24,5
0,500	14,01 "	28,4
0,125	67,10 "	23,6

Es zeigte sich, daß die prozentuale Hemmung der Enzymaktivität bei längeren Abbauzeiten zwischen 3,93 und 67,10 Minuten in etwa gleich bleibt. Jedoch wirkt sich bei höheren Enzymkonzentrationen, bei denen bereits in weniger als 2 Minuten 50 % der ursprünglichen Viskosität verloren gehen, die Hemmung stärker aus.

Die relative Aktivität (RA) der Enzymlösung bei jeder der gewählten Konzentrationsstufen dieses Versuches ist aus der Abb. 5 zu ersehen. Die Gerade verbindet die aus dem Meßwert für die 6 %ige Enzymlösung unter der Voraussetzung einer linearen Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Aktivität errechneten Werte. Die mit x bezeichneten Punkte entsprechen dagegen den festgestellten Meßwerten. Tatsächlich ergibt sich also eine deutliche lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration und relativer Aktivität. Selbst bei starker Verdünnung der ursprünglichen Lösung und den sich daraus ergebenden sehr langen Meßzeiten bis zur Erreichung eines 50 %igen Viskositätsverlustes stimmen die theoretisch zu erwartenden und die tatsächlich gemessenen Werte relativ gut überein.

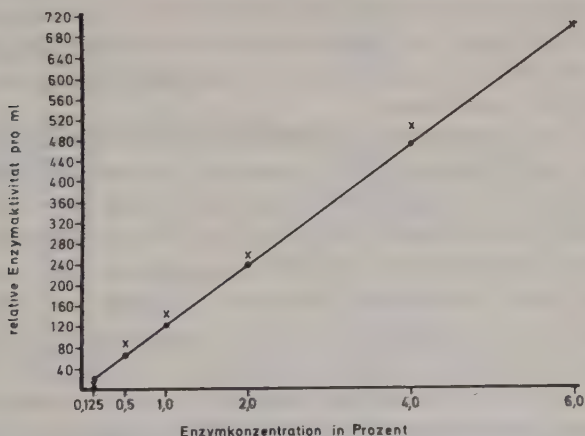


Abb. 5: Beziehung zwischen verschiedenen Enzymkonzentrationen und der relativen Aktivität von Zellulase (C_x)

b) Auslese wirksamer Inhibitoren gegenüber PG und C_x

Bei einem Vergleich der in Tab. 3 zusammengefaßten Ergebnisse der Hemmversuche zeigt sich zunächst, daß der Effekt der getesteten Substanzen, sofern ein solcher überhaupt zu beobachten ist, auf die PG- und die C_x-Aktivität in etwa gleich ist. Als fast völlig wirkungslos gegenüber beiden Enzymen erweisen sich dabei die einfachen Phenole wie Brenzkatechin, Pyrogallol und Gallussäure. Polymere Verbindungen dieses Typs wie Digallussäure und der Gerbstoff Tannin sind hingegen ausgezeichnete Inhibitoren, wobei ihre Wirksamkeit gegenüber der Zellulase etwas besser ist als gegenüber der PG. Selbst bei 10^{-4} M bzw. 10 ppm, den niedrigsten der 3 gewählten Konzentrationen, ist noch eine Hemmung der Enzymaktivität durch die beiden Substanzen nachweisbar. Ein ebenfalls ausgezeichnet wirksamer Inhibitor ist p-Chlormercuribenzoessäure. Sie ist allerdings in dest. Wasser außerordentlich schwer löslich und wurde daher mit einem Ultra Turrax-Gerät bei 24000 Umdr./Min. soweit wie möglich homogenisiert. Die beiden Acridinderivate "Trypaflavin" (= 3,6-Diamino-10-methylacridin-Cl) und "Rivanol" (= 3,9-Diamino-7-äthoxyacridin) führten zu Ausfällungen der Enzymlösung bei beiden Substraten; in 10^{-3} molarer Konzentration waren beide Substanzen unwirksam.

Außer dem 2-Methyl-1,4-Naphthochinon (= Menadion) und dem Na-Anthrachinon- β -sulfonat hemmten die übrigen Chinonverbindungen beide Enzyme deutlich. Vor allem gilt dies für Na- β -Naphthochinonsulfonat und 1,2,5,8-Tetraoxyanthrachinon (= Chinalizarin); bei letzterem jedoch nur dann, wenn es wegen seiner Schwerlöslichkeit mit dem bereits erwähnten Homogenisator ebenfalls so weit wie möglich in Lösung gebracht wird. Ähnlich mußte auch mit dem schwerlöslichen Fe-dimethyl-dithiocarbamat verfahren werden. Von den übrigen Carbamaten verdient vorallem das als Fungizid bekannte Zink-äthylen-bisdithiocarbamat wegen seiner bei einer Konzentration von 10^{-2} M zu beobachtenden starken Hemm-

Tabelle 3: Einfluß verschiedener Substanzen auf die PG- und C_x -Aktivität

Geprüfte Substanzen	Konz. ¹⁾	Hemmung in Prozent	
		PG	C _x
<u>1. SH-Inhibitoren</u>			
Maleinsäure	10 ⁻² M	3	0
Maleinsäurehydrazid	10 ⁻² M	0	0
p-Chlormercuribenzoessäure	10 ⁻² M	78	98
	10 ⁻³ M	-	87
	10 ⁻⁴ M	-	16
<u>2. Acridinderivate</u>			
3,6-Diamino-10-methylacridin-Cl (= Trypaflavin)	10 ⁻² M	geliert	
	10 ⁻³ M	0	9
3,9-Diamino-7-äthoxyacridin (= Rivanol)	10 ⁻² M	geliert	
	10 ⁻³ M	0	0
<u>3. Phenole</u>			
Phenol	10 ⁻² M	0	0
Brenzkatechin	10 ⁻² M	0	0
Pyrogallol	10 ⁻² M	12	0
Gallussäure	10 ⁻² M	0	0
Gallussäure-Methylester	10 ⁻² M	0	0
<u>4. Gerbstoffe u. ähnl. Substanzen</u>			
Digallussäure	10 ⁻² M	88	100
	10 ⁻³ M	32	40
	10 ⁻⁴ M	8	7
Tannin	1000 ppm	58	93
	100 ppm	20	25
	10 ppm	4	9

1) Die hier angegebenen Werte für die Hemmstoffkonzentrationen beziehen sich auf die Konzentration im Reaktionsgemisch während des Abbaus im Viskosimeter.

Tabelle 3: Fortsetzung

Geprüfte Substanzen	Konz.	Hemmung in Prozent	
		PG	C _x
5. <u>Chinone</u>			
Benzochinon	10 ⁻² M	46	27
2-Methyl-1,4-Napthochinon (= Menadion)	10 ⁻² M	0	3
Na-β-Napthochinonsulfonat	10 ⁻² M	68	51
	10 ⁻³ M	25	24
	10 ⁻⁴ M	0	4
1,4-Dioxyanthrachinonsulfon- säure (= Rufiansäure)	10 ⁻² M	19	17
	10 ⁻³ M	3	3
	10 ⁻⁴ M	0	0
Na-1,2-Dioxyanthrachinonsul- fonat (= Alizarin S)	10 ⁻² M	32	24
	10 ⁻² M	8	0
Na-Antrachinon-β-sulfonat	10 ⁻² M	8	0
1,2,5,8-Tetraoxyanthrachinon (= Ghinalizarin)	10 ⁻² M	71	90
	10 ⁻³ M	26	43
	10 ⁻⁴ M	0	10
6. <u>Carbamate</u>			
Zink-äthylen-bisdithiocar- bamat	10 ⁻² M	75	74
	10 ⁻³ M	9	-
Dinatrium-äthylen-bisdithio- carbamat	10 ⁻² M	-	14
Ferri-dimethyl-dithiocarbamat	10 ⁻² M	56	80
Natrium-dimethyl-dithiocarbamat	10 ⁻² M	7	13
7. <u>Detergentien</u>			
Dodecylsulfat	500 ppm	28	-
Tween 40	500 ppm	4	0
Triton X 100	500 ppm	3	4
Span 85	1000 ppm	0	0
Tween 85	1000 ppm	0	0

Tabelle 3: Fortsetzung

Geprüfte Substanzen	Konz.	Hemmung in Prozent	
		PG	C _x
Cetyltrimethylammoniumbromid	10 ⁻² M	geliert	
Laurinsäuremonoöthanolamid	500 ppm	0	0
F 208 (Alkylsulfat)	500 ppm	7	-
Alkylarylsulfonat	500 ppm	100	100
	150 ppm	90	34
	75 ppm	57	26
	50 ppm	31	16
<u>8. Sonstige org. Substanzen</u>			
1-Naphthol	10 ⁻² M	70	77
2,5-Dimethylbenzolsulfonsäure	10 ⁻² M	0	0
β-Naphtalinsulfonsäure	10 ⁻² M	-	1
Pyridoxoliumchlorid	10 ⁻² M	4	0
Semicarbazid-hydrochlorid	10 ⁻² M	27	0
<u>9. Alkalimetallsalze</u>			
Lithiumsulfat	10 ⁻² M	0	0
Natriumcarbonat	10 ⁻² M	0	0
Kaliumbromid	10 ⁻² M	0	0
Rubidiumchlorid	10 ⁻² M	0	4
Caesiumchlorid	10 ⁻² M	0	6
<u>10. Erdalkalimetallsalze</u>			
Berylliumnitrat	10 ⁻² M	16	-
Strontiumchlorid	10 ⁻² M	geliert	
			14
<u>11. Schwermetallsalze</u>			
Manganchlorid	10 ⁻² M	11	0
Ammoniumeisen-(III)-sulfat	10 ⁻² M	15	16
Eisen(II)-chlorid	10 ⁻² M	-	28
Kobaltnitrat	10 ⁻² M	8	7
Nickelnitrat	10 ⁻² M	-	21
Nickelsulfat	10 ⁻² M	5	0

Tabelle 3: Fortsetzung

Geprüfte Substanzen	Konz.	Hemmung in Prozent	
		PG	C _x
Kupfernitrat	10 ⁻² M	35	36
Kupferchlorid	10 ⁻² M	55	97
Silbernitrat	10 ⁻³ M	61	-
	10 ⁻² M	89	95
Zinksulfat	10 ⁻² M	0	6
Cadmiumsulfat	10 ⁻² M	geliert	31
Quecksilberchlorid (Sublimat)	10 ⁻² M	100	95
Zinnchlorid	10 ⁻² M	32	22
Bleiacetat	10 ⁻² M	geliert	15
Bleichlorid	10 ⁻² M	geliert	34
<u>12. Sonstige Metallverbindungen</u>			
Titanoxyd	10 ⁻² M	10	9
Chromoxyd	10 ⁻² M	4	2
Molybdänoxyd	10 ⁻² M	3	2

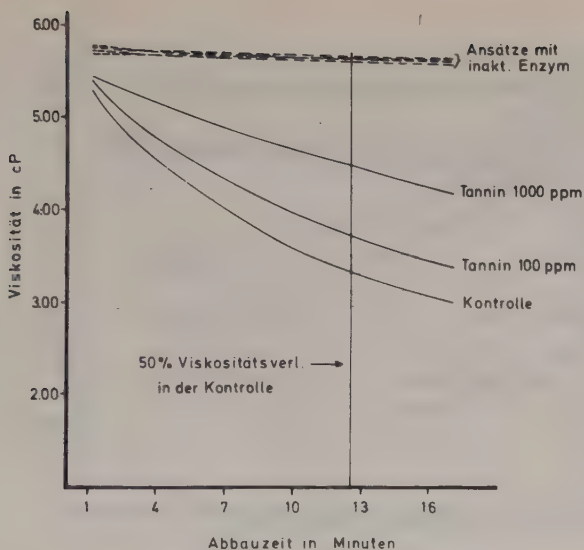


Abb. 6: PG-Hemmung durch Tannin

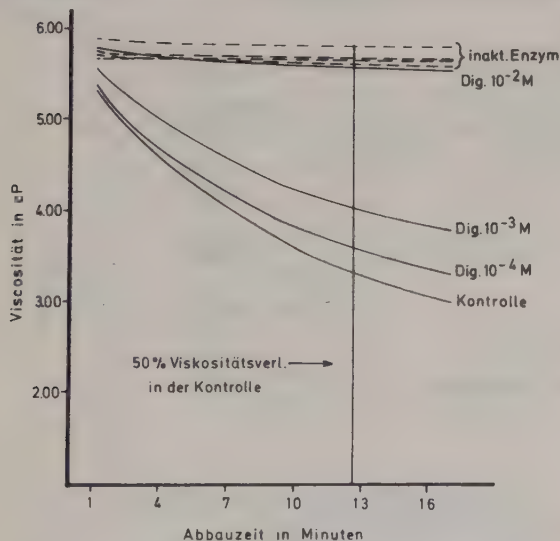


Abb. 7: PG-Hemmung durch Digallussäure

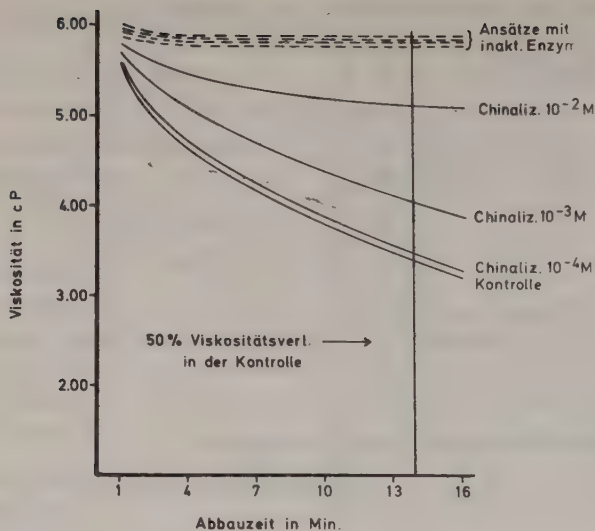


Abb. 8: PG-Hemmung durch Chinalizarin

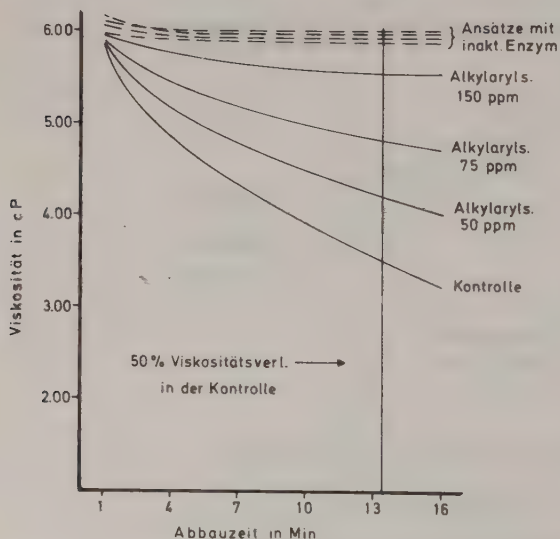


Abb. 9: PG-Hemmung durch Alkylarylsulfonat

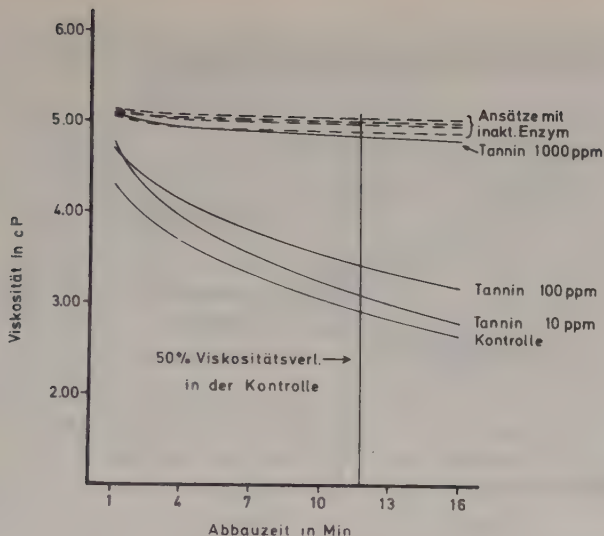


Abb. 10: C_x -Hemmung durch Tannin

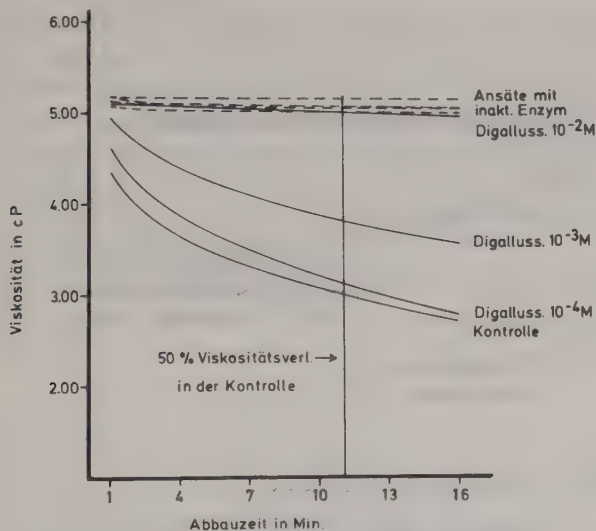


Abb. 11: C_x -Hemmung durch Digallussäure

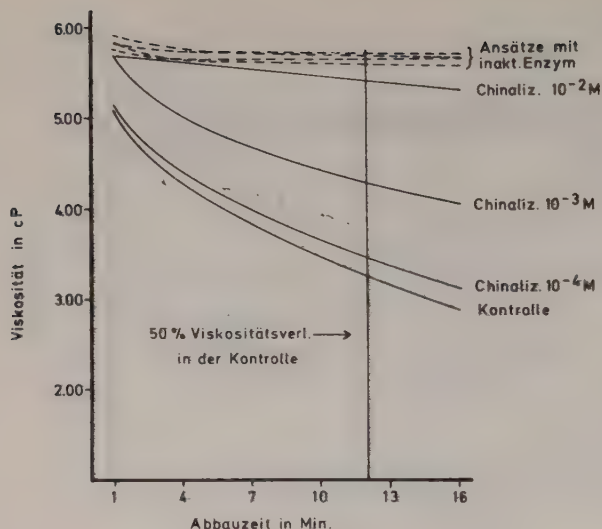


Abb. 12: C_X -Hemmung durch Chinalizarin

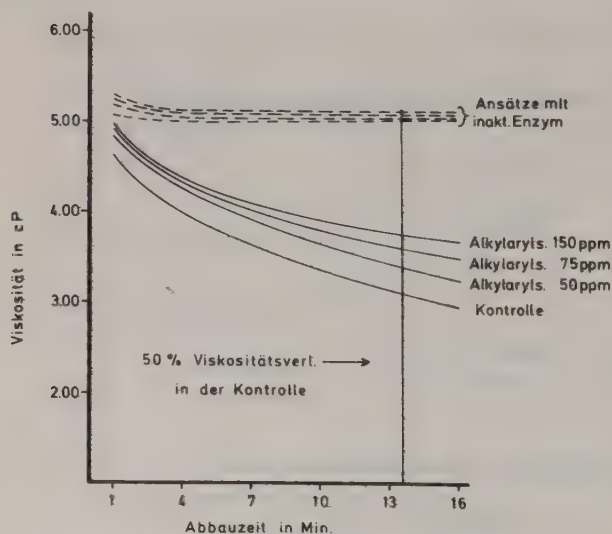


Abb. 13: C_X -Hemmung durch Alkylarylsulfonat

wirkung besondere Erwähnung; in einer Konzentration von 10^{-3} M angewendet hemmt es jedoch nur noch unbeträchtlich.

Oberflächenaktive Substanzen (Detergentien oder Tenside) wirken nicht generell als Inhibitoren; einige von ihnen hatten, zumindest in den verwendeten Konzentrationen, überhaupt keinen Effekt. Jedoch erwies sich Alkylarylsulfonat, eine in vielen Waschmitteln vorkommende Substanz¹⁾ als die bei weitem wirksamste aller überhaupt getesteten Verbindungen. Bei einer Konzentration von 500 ppm wird durch sie sowohl der Abbau von Pektinsäure als auch von CMC völlig verhindert. Bei 150 ppm ergibt sich hinsichtlich der PG noch eine 90 %ige Hemmung und auch bei 50 ppm ist eine solche noch deutlich zu erkennen. Gegenüber C_x ist im niedrigsten Konzentrationsbereich die Hemmung jedoch nur noch gering.

α -Naphthol wurde nur in 10^{-2} molarer Konzentration angewendet; sein Inhibitoreffekt ist in dieser Konzentration beträchtlich.

Die getesteten Alkalimetallsalze sind völlig wirkungslos. Zwei Erdalkalimetallsalze zeigen ebenfalls nur einen sehr geringen Effekt. Einige Schwermetallsalze, vor allem Hg-, Ag- und Cu-Verbindungen, erweisen sich demgegenüber als hochwirksame Inhibitoren. Bleiverbindungen waren in den gewählten Konzentrationen nur gegen die Zellulase wirksam, im Hinblick auf die PG-Aktivität getestet führten sie zu Ausfällungen des Substrates.

Als Beispiele einiger Abbaukurven bei Verwendung wirksamer Inhibitoren sind hier die Abb. 6 - 13 wiedergegeben.

1) Den Rei-Werken AG, Koblenz, sei für die Überlassung dieses Präparates recht herzlich gedankt.

c) PME-Hemmung ausgewählter Substanzen

Von den in einem späteren Versuch als weniger fungitoxisch festgestellten und daher für die Versuche in vivo aus-
gelesenen Hemmstoffen erwiesen sich Digallussäure und Tannin
als die wirkungsvollsten PME-Inhibitoren (Tab. 4). In
Konzentrationen von 10^{-2} M bei Digallussäure bzw. 1000 ppm
bei Tannin war fast keine Freisetzung von Säuregruppen
nachweisbar und auch geringere Konzentrationen, wie 10^{-3} M
bzw. 100 ppm, hemmten das Enzym noch sehr gut.

Rufiansäure war deutlich wirksamer als in den vorhergehen-
den Versuchen gegenüber PG und C_x ; die Hemmung durch
Chinalizarin ist demgegenüber wesentlich geringer. Alkyl-
arylsulfonat erweist sich auch hier als guter Inhibitor,
wenn auch etwas schwächer als gegenüber der PG.

Tabelle 4: Prozentuale Hemmung der Pektinmethylesterase
durch ausgewählte Substanzen.

Substanzen	Konz.	Verbrauch an 0,01 n NaOH in ml	%-Hemmung
Kontrolle	-	3,64	-
Digallussäure	10^{-2} M	0,08	97,9
	10^{-3} M	1,94	46,8
Tannin	1000 ppm	0,17	95,4
	100 ppm	2,53	30,5
Rufiansäure	10^{-2} M	1,28	64,9
	10^{-3} M	3,21	11,9
Chinalizarin	10^{-2} M	2,24	38,5
Alkylaryl- sulfonat	150 ppm	1,03	71,8
	75 ppm	2,75	24,5

d) Untersuchungen über die Fungitoxizität einiger besonders wirksamer Enzyminhibitoren

In diesem Versuch wurden in erster Linie jene Substanzen getestet, die gegenüber den pektischen und zellulolytischen Enzymen in den vorangegangenen Untersuchungen eine deutliche Hemmwirkung gezeigt hatten. Außerdem Rufiansäure sowie Gallussäure, letztere als mögliches Spaltprodukt von Tannin und Digallussäure.

Ziel der Versuche war es, für die weiteren Versuche in vivo möglichst solche Substanzen auszuwählen, die bei einer hohen Wirksamkeit gegen die genannten Enzyme für den Pilz selbst wenig toxisch sind. Als besonders fungitoxisch in Konzentrationen von 10^{-2} M und damit für die weiteren Versuche ungeeignet erwiesen sich: Benzochinon, Alizarin S, α -Naphthol sowie Na- β -naphthochinon-sulfonat und Zink-äthyl-bisdithiocarbamat; bei den beiden letzteren zeigte sich auch in niedrigeren Konzentrationen noch eine starke Toxizität gegenüber dem Pilz (Tab. 5). Kupferchlorid unterdrückt zwar in einer Konzentration von 10^{-2} M das Myzelwachstum des Pilzes nicht vollkommen, jedoch ist seine wachstumshemmende Wirkung in einer Konzentration von 10^{-3} M noch derart hoch, daß es ebenfalls für weitere Versuche ungeeignet erschien. Die ausgezeichnete Wirkung des Alkylarylsulfonates als Enzyminhibitor wird leider durch seine Fungitoxizität noch übertroffen; selbst 10 ppm waren noch deutlich wirksam. Als relativ wenig fungitoxisch verblieben somit die Verbindungen:

Tannin
Digallussäure
Chinalizarin
Rufiansäure

Auch Alkylarylsulfonat wurde trotz seiner hohen Fungitoxizität in den weiteren Versuchen vergleichsweise verwendet.

Tabelle 5: Fungitoxizität verschiedener Enzyminhibitoren gegenüber Rhizoctonia solani, Stamm R-B

Inhibitor	Konz.	Hemmung des Pilzwachstums in %
Gallussäure	$10^{-2}M$	17,3
Digallussäure	$10^{-2}M$	69,8
	$10^{-3}M$	38,6
	$10^{-4}M$	1,5
Tannin	1000 ppm	56,0
	100 ppm	10,9
	10 ppm	1,8
Benzochinon	$10^{-2}M$	100,0
Na- β -naphthochinon-sulfonat	$10^{-2}M$	100,0
	$10^{-3}M$	55,8
	$10^{-4}M$	9,5
1,4-Dioxyanthrachinon-sulfonsäure (Rufiansäure)	$10^{-2}M$	74,6
	$10^{-3}M$	45,9
	$10^{-4}M$	4,8
Alizarinsulfonsäures-Na (Alizarin S)	$10^{-2}M$	100,0
1,2,5,8-tetraoxyanthrachinon (Chinalizarin)	$10^{-2}M$	46,3
	$10^{-3}M$	38,9
	$10^{-4}M$	34,9
Zink-äthylen-bisdithiocarbamat	$10^{-2}M$	100,0
	$10^{-3}M$	96,3
	$10^{-4}M$	67,2
Alkylarylsulfonat	200 ppm	100,0
	100 ppm	100,0
	50 ppm	91,0
	10 ppm	31,4
L-Naphthol	$10^{-2}M$	100,0
Kupferchlorid	$10^{-2}M$	87,4
	$10^{-3}M$	78,4
	$10^{-4}M$	36,7

C. VERSUCHE IN VIVO

=====

I. Material und Methoden

=====

1. Versuche mit Kartoffelgewebe und Bohnenhypokotylen

In diesem Versuchsabschnitt wurden die in vitro gegenüber den pektischen und zellulolytischen Enzymen von Rhizoctonia solani wirksamen Inhibitoren Digallussäure, Tannin, Rufiansäure, Chinalizarin und Alkylarylsulfonat in Kartoffelknollengewebe und Bohnenhypokotyle infiltriert. Der pH-Wert der Lösungen war 6,0 und entsprach damit in etwa dem der Gewebe. Den Kontrollen wurde anstelle der Inhibitoren dest. Wasser appliziert. Als Inokulum für das Kartoffelgewebe diente der Stamm D 5, für die Bohnenhypokotyle der Stamm R-B von BATEMAN. Beide hatten sich hierzu in Vorversuchen mit insgesamt 10 Stämmen deshalb als am besten geeignet erwiesen, weil sie im Gegensatz zu den übrigen, mehr diffus das Gewebe überwachsenden Stämmen ein scharf begrenztes Myzelwachstum zeigten und dabei gleichzeitig das Gewebe kontinuierlich und gut meßbar mazerierten. Im einzelnen wurden die Versuche folgendermaßen durchgeführt:

a) Infiltration von Kartoffelknollengewebe. Von vier vorweg erprobten Kartoffelsorten wurde die Sorte "Delos" am stärksten mazeriert und daher für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Um Fremdinfectionen soweit wie möglich auszuschließen, wurden die Knollen zunächst unter scharfem Wasserstrahl von der anhaftenden Erde gut gereinigt und danach in Chlorkalklösung und Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden sie geschält, nochmals kurz in Chlorkalklösung eingetaucht und in dest. Wasser abgespült. Trotz einer Lagertemperatur von 15 - 20°C für die letzten 4 Wochen vor Versuchsbeginn war das Gewebe zum Versuchszeitpunkt noch relativ turgeszent. Da es deshalb fraglich erschien, ob die Inhibitorlösungen bei der

Infiltration in genügender Menge in das Gewebe aufgenommen wurden, wurden die Versuche in 2 Variationen durchgeführt. Einmal mit diesem relativ festen Gewebe, zum anderen jedoch wurden die gereinigten und geschälten Knollen für 48 Std. im Trockenschrank einer Temperatur von 27° C ausgesetzt. Zur Weiterverarbeitung wurde das Gewebe zunächst auf einer mit 70 %igem Alkohol desinfizierten Glasplatte in Würfel von 50 - 60 mm Kantenlänge zerschnitten. Mit einem Korkbohrer von 4 mm Ø wurden dann hieraus Gewebezylinder ausgestochen, in sterile Petrischalen übertragen und, um eine Verkleisterung der Geweboberfläche durch die beim Ausstechen der Zylinder aus den beschädigten Zellen freigewordene Stärke zu verhindern, in sterilem dest. Wasser gespült. Anschließend wurden sie mit den Inhibitorlösungen infiltriert.

Die Infiltration erfolgte auf folgende Weise: Nachdem die mit den Inhibitorlösungen bzw. mit sterilem dest. Wasser (als Kontrolle) bedeckten Proben in einen Exsikkator eingestellt worden waren, wurde dieser mit einer Wasserstrahlpumpe auf einen Innendruck von etwa 15 mm Hg evakuiert und dabei gleichzeitig ein Teil der Luft aus den Interzellularen des Gewebes entfernt. Durch vorsichtiges Öffnen des Verschlußhahnes wurde dann ein Druckausgleich langsam wieder hergestellt. Es sei nur erwähnt, daß ein zu schneller Druckausgleich zu einem baldigen Kollaps der Gewebe und einem verstärkten Auftreten von Fremdinfectionen führt. Damit scheint sich die Ansicht von MOTHES (1933) zu bestätigen, daß sich während des Infiltrationsvorganges auch bei aller Vorsicht ein Eindringen von Bakterien in die Interzellularen nicht vermeiden läßt, daß ein Vorhandensein derselben in diesen aber solange ohne Bedeutung ist, als nicht durch zu schnellen Druckausgleich Zellbeschädigungen hervorgerufen und sie durch die dabei freiwerdenden Inhaltsstoffe in ihrer Entwicklung gefördert werden. Nach Beendigung der Infiltration wurden die Zylinder nochmals einzeln mit sterilem dest. Wasser abgespült, um die äußerlich anhaftenden und

nicht in die Interzellularen eingedrungenen Hemmstofflösungen zu entfernen, in sterile 70,0 mm lange und 7,0 mm weite Reagenzgläsern übertragen und diese mit einem ebenfalls sterilen Wattestopfen verschlossen.

Zur Beimpfung wurden aus der Randzone 5 - 6 Tage alter Kulturen mit einem Korkbohrer ($\varnothing$ 5,5 mm) myzelbewachsene Agarscheibchen entnommen und auf das obere Ende der zylinderförmigen Gewebeproben übertragen (Abb. 14). Das Inokulum war auf Kartoffeldextrose-Agar, 15 ml je Petrischale, angezogen worden. Die für die Anzucht des Inokulums verwendete Agarmenge pro Petrischale scheint insofern einen Einfluß auf die Intensität des Befalls zu haben, als damit dem Pilz ein gewisses Nährstoffreservoir mitgegeben wird (vgl. auch SPRECHER 1963). In Vorversuchen waren bei Verwendung von 10 ml Agar die erhaltenen Infektionen deutlich schwächer. Es scheint, daß in diesem Fall die dem Pilz zunächst zur Verfügung stehenden Nährstoffe zur Entwicklung einer für die Gewebebesiedlung ausreichenden Infektionspotenz nicht genügen.



Abb. 14: Zylinderförmige Gewebeprobe mit myzelbewachsenem Agarscheibchen beimpft.

Die beimpften Proben wurden für 6 - 9 Tage bei 27°C inkubiert.

Die Anzahl der Parallelen betrug jeweils 15 für eine Variante; jeder Versuch wurde 2 - 4 mal wiederholt.

b) Infiltration von Bohnenhypokotylen. Buschbohnen der Sorte "Goldursel", in ein Sand:Kompost-Gemisch (Verh. 5:1) in Plastikschaalen ausgelegt, wurden in einem verdunkelten Brutschrank bei 26°C angezogen. Die rel. Luftfeuchtigkeit stieg innerhalb von 12 Std. auf über 90 %; ein Begießen, außer bei der Aussaat, war daher während der siebentägigen Anzucht nicht nötig. Nach Ablauf dieser Frist hatten die sehr stark vergeilten, fast weißen Keimlinge eine Höhe von etwa 10 bis 12 cm erreicht; Laubblätter waren meist noch nicht entwickelt. In diesem Stadium wurden die Pflanzen knapp über dem Boden abgeschnitten und in der Länge halbiert. Obwohl sich in der Anfälligkeit der oberen und der unteren Abschnitte keine deutlichen Unterschiede zeigten, wurden in der Regel nur die unteren, etwa 5 cm langen Teile der Hypokotyle weiterverarbeitet. Dazu wurden sie zunächst in Leitungswasser von allen äußerlich anhaftenden Schmutzpartikeln gut gereinigt, in sterilem dest. Wasser gespült und in sterile Petrischalen übertragen. In einem Vorversuch wurden die Bohnenhypokotylstücke vor dem Infiltrieren vergleichsweise für 2 Min. in 70 %igen Alkohol eingelegt und anschließend in sterilem dest. Wasser mehrmals gespült.

Die Infiltration und Inokulation erfolgte auf die gleiche Weise wie für Kartoffelgewebe beschrieben. Als Infektionsmaterial dienten myzelbewachsene Agarscheibchen aus der Randzone 2 - 3 Tage alter Kulturen des Stammes R-B. Zwecks Feststellung des Einflusses der Vorkultur des Inokulums auf die Mazeration wurden zur Anzucht des Pilzes zunächst Biomalz-, Pektin-Zellulose-, Kartoffeldextrose- und Bohnen-Malz-Agar, in den späteren Versuchen nur noch letzterer verwendet.

Die Inkubationstemperatur betrug 26°C bei über 90 % rel. Luftfeuchtigkeit, die Inkubationszeit 2 - 3 Tage.

c) Einstellen von Bohnenkeimlingen in Hemmstoff-Lösungen.
Die Anzucht der Keimlinge erfolgte ebenfalls im verdunkelten Brutschrank bei 26°C und etwa 95 % rel. Luftfeuchtigkeit. Ein kleinerer Teil der Pflanzen wurde mit der Wurzel unter Aufschwemmung des sie umgebenden Bodens aus der Pflanzschale entnommen, in Leitungswasser abgespült und mit den Wurzeln in 50 ml-Weithals-Erlenmeyerkölbchen bei 27°C im Brutschrank in die Hemmstofflösungen eingestellt. Die übrigen Pflanzen wurden über dem Boden abgeschnitten, in Leitungswasser gesäubert und auf die gleiche Weise bei 27°C in die Lösungen gebracht (Abb. 15). Als Kontrolle dienten jeweils in dest. Wasser eingestellte Pflanzen. Nach 20 - 24 Std. wurden die Pflanzen den Lösungen entnommen, auf jeweils etwa 5 cm lange Hypokotylstücke gekürzt und diese nach Übertragung in die Reagenzgläschen in der schon beschriebenen Weise mit dem Stamm R-B beimpft und inkubiert.



Abb. 15: Etiolierte Bohnenhypokotyle, nach Entrernen der Wurzeln in die Inhibitorlösungen eingestellt.

d) Messung und Auswertung des Befalls. Bei allen 3 Versuchsanstellungen wurde zunächst die Gesamtlänge der Gewebezylinder bzw. der Hypokotylabschnitte gemessen. Anschließend wurden durch Reiben zwischen den Fingern die durch den Pilz mazerierten Gewebeteile von dem gesunden Gewebe entfernt. Letzteres wurde dann nochmals gemessen und der erhaltene Wert von der Gesamtlänge abgezogen; aus der Differenz ergab sich somit die Länge des vom Pilz besiedelten und zerstörten Abschnitts, die als Maß für das Fortschreiten des Krankheitsprozesses dienen kann.

Die statistische Sicherung der ermittelten Befallsunterschiede erfolgte nach einem von DIXON und MOOD (1946) angegebenen "Vorzeichentest".

2. Versuche an bewurzelten Bohnenkeimlingen

Die Gewächshausversuche mit Buschbohnen (Phaseolus vulgaris) der Sorte "Goldursel" wurden in zwei verschiedenen Variationen durchgeführt, einmal an Pflanzen mit Kotyledonen ohne eine zusätzliche Nährstoffgabe, zum anderen an solchen ohne Kotyledonen, denen dann jedoch Nährstoffe über den Boden zugeführt wurden. Das Entfernen der Kotyledonen hatte den Zweck, die Wurzeltätigkeit der Pflanzen zu intensivieren und damit eine verstärkte Aufnahme der Inhibitoren zu erreichen.

a) Bohnenkeimlinge mit Kotyledonen. Plastiktöpfe mit einer lichten Weite von 10 cm und einer Höhe von 8 cm wurden mit 225 g lufttrockenem, gesiebttem Flußsand gefüllt. Vor dem Auslegen der Samen wurden jeweils 8 Töpfe mit je 100 ml folgender Lösungen angefeuchtet: Digallussäure 2×10^{-3} M, Tannin 2000 ppm, Rufiansäure 10^{-3} M, Alkylarylsulfonat 50 ppm, Chinalizarin 10^{-2} M, "F 461"¹⁾ 10^{-4} M, dest. Wasser (Kontrolle). Der pH-Wert der gelösten Substanzen wurde mit

1) "F 461" diente als Vergleichssubstanz; es ist als Fungizid mit systemischer Wirkung gegen Basidiomyceten bekannt (vgl. v. SCHMELING und KULKA 1966).

NaOH bzw. H_2SO_4 auf pH 6,0 eingestellt, um evtl. pH-Effekte auszuschließen. Je Topf wurden 6 Samen ausgelegt und mit trockenem Sand gleichmäßig bedeckt.

Die Gewächshaustemperatur während der Anzucht der Pflanzen lag im Mittel bei 27°C. Am 4. Tag nach dem Auslegen wurden die Töpfe erneut mit 70 ml der obengenannten Lösungen angefeuchtet. Weiteres Gießen erfolgte dann je nach Bedarf in Abständen von 2 bis 3 Tagen, jedoch für alle Töpfe in der jeweils gleichen Menge.

Die Infektion der Pflanzen wurde am 9. Tag nach dem Auslegen der Samen durchgeführt. Als Inokulum diente der Stamm G 7 von Rhizoctonia solani, in Anlehnung an BATEMAN und LUMSDEN (1965) auf folgende Weise angezogen: 200 g Kartoffeln wurden in Scheiben zerschnitten und in einem Liter Wasser gekocht. Nach 20 Minuten wurde die Lösung durch Watte abfiltriert und wieder auf die ursprüngliche Menge aufgefüllt. 20 g Pektin wurden mit einem Ultra Turrax-Gerät hierin eingebracht, die Lösung zu jeweils 40 ml in 100 ml-Erlenmeyerkölbchen abgefüllt, durch Autoklavieren bei 130°C sterilisiert, mit myzelbewachsenen Agarstückchen beimpft und bei 27°C inkubiert.

Zur Inokulation der Pflanzen wurde jeweils eine Myzelmatte einer 5 - 7 Tage alten Kultur mit dem Ultra Turrax-Gerät für eine Minute in 200 ml dest. Wasser homogenisiert. Jeweils 1,5 ml dieser Suspension wurden mit einer Pipette über die Stengelbasis jeder einzelnen Pflanze geträufelt. Die Gewächshaustemperatur lag auch nach der Infektion im Mittel bei 27°C. Innerhalb einer Zeitspanne von mindestens 15 Std. vor und nach der Inokulation wurden die Pflanzen nicht mit den Inhibitorlösungen gegossen, um eine direkte Einwirkung derselben auf das Inokulum in den ersten Stadien der Infektion nach Möglichkeit zu vermeiden.

Die Befallsbeurteilung erfolgte nach 3 Tagen anhand einer 6-stufigen Skala nach BATEMAN und LUMSDEN (1965), wobei 0 keinen, 5 den höchsten Befall angibt (vgl. Abb. 16).



Abb. 16: Bewertung des Rhizoctonia-Befalls an Bohnenkeimlingen.

- Von links: 0 = kein Befall
1 = eine kleinere Läsion
2 = zwei kleinere oder eine größere Läsion
3 = drei kleinere oder eine bis zwei größere Läsionen
4 = Läsion umfaßt nicht den gesamten Wurzelhals
5 = Läsion umfaßt den gesamten Wurzelhals

Die statistische Verrechnung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse.

b) Bohnenkeimlinge ohne Kotyledonen. Die Anzucht der Pflanzen und des Inokulums, die Beimpfung und Befallsbeurteilung sowie die statistische Verrechnung der Ergebnisse erfolgten im Prinzip auf die gleiche Weise wie im vorigen Abschnitt. Die Versuche unterschieden sich von den vorhergehenden lediglich durch folgende Abweichungen: Zunächst wurde der lufttrocken in die Töpfe eingefüllte Sand nicht mit den Inhibitorlösungen, sondern mit Leitungswasser angefeuchtet. Erst vom vierten Tag nach dem Auslegen der Samen an wurde den Keimlingen normale Hoagland-Nährlösung gemeinsam mit den darin gelösten Hemmstoffen verabreicht. Alkylarylsulfonat wurde hier in einer Konzentration von 75 ppm appliziert. Die Kombination von Nähr-

lösung und Hemmstoffen (bzw. als Kontrolle nur Nähr-
lösung) wurde im weiteren Verlauf des Versuches je nach
Bedarf, jedoch für alle Varianten in gleicher Menge ge-
geben. Im Alter von 5 - 6 Tagen, nachdem die ersten Laub-
blätter entfaltet worden waren, wurden die Kotyledonen
bei allen Pflanzen entfernt. Die Anordnung des Versuches
erfolgte in Blockanlage mit zufälliger Verteilung der
Varianten. Wegen der nach dem Entfernen der Kotyledonen
beobachteten höheren Anfälligkeit der Pflanzen mußte
die Myzelsuspension im Vergleich zu den früheren Versu-
chen im Verhältnis 1:1 mit dest. Wasser verdünnt werden
(somit 1 Myzelmatte in 400 ml dest. Wasser).

II. Ergebnisse

=====

1. Versuche mit Kartoffelknollengewebe

a) Einfluß der Vorbehandlung der Gewebe auf die beim Infiltrieren aufgenommene Inhibitormenge

Ausgangspunkt für diesen Versuch war die Tatsache, daß in Vorversuchen Kartoffelknollengewebe mit und ohne vorherige Wärmebehandlung, nachdem es mit Rufiansäure infiltriert worden war, in sehr unterschiedlichem Maße mazeriert wurde. Um festzustellen, ob diese unterschiedliche Mazerationsbeeinflussung auf eine verschieden starke Rufiansäure-Aufnahme zurückzuführen sei, wurden Kartoffelgewebezyylinder der Sorte "Delos" nach folgenden Vorbehandlungen hergestellt:

- a) sehr turgeszente Knollen (im Keller gelagert),
- b) weniger turgeszente Knollen (bei Zimmertemperatur gelagert)
- c) wie b, Knollen geschält und für 48 Std. im Brutschrank einer Temperatur von 27°C ausgesetzt.

Die Gewebezyylinder der drei Varianten wurden gemeinsam mit 10^{-2} M Rufiansäure infiltriert. Anschließend wurde der Hemmstoff mit Alkohol wieder aus den Geweben extrahiert und seine Konzentration bestimmt. Hierzu wurden jeweils 7 Gramm der infiltrierten Gewebe in dünne Scheibchen von etwa 1 - 2 mm Dicke zerschnitten, mit 100 ml 80 %igen Alkohol übergossen und der Alkohol auf dem Wasserbad unter mehrmaligem Umrühren zum Sieden gebracht. Nach dem Abkühlen wurde der Überstand abfiltriert und das Sediment auf die gleiche Weise erneut mit Alkohol extrahiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis Sediment und Überstand keine Rotfärbung durch Rufiansäure mehr zeigten. Die jeweils erhaltenen Extrakte aus einer Gewebeprobe wurden zusammengegossen, mit 80 %igem Alkohol auf ein für alle vier Varianten gleiches Volumen von 500 ml aufgefüllt und ihre optische Dichte im Beckman-

Spektralphotometer bei 480 m μ - dem Absorptionsmaximum der Rufiansäure - gemessen. Anhand einer Michkurve konnte dann die bei der Infiltration aufgenommene Rufiansäuremenge pro Gramm Gewebe ermittelt werden (Tab. 6).

abelle 6: In Kartoffelgewebe unterschiedlicher Vorbehandlung beim Infiltrieren aufgenommene Menge an Rufiansäure in mg pro Gramm Gewebe.

Vorbehandlung	Opt.Dichte d. Extrakte	Ruf.-Konz. anh.d. Eich- kurve	mg Rufians. pro g Gewebe
Lagerung im Keller	0,048	$10^{-6}M$	0,023
Lagerung bei Zimmertemperatur	0,096	$8,7 \times 10^{-6}M$	0,200
Geschält, 48 Std. bei 27°C gelagert	0,160	$1,9 \times 10^{-5}M$	0,437

Es zeigt sich, daß bei der Infiltration der Inhibitor je nach der Vorbehandlung der Gewebe in sehr unterschiedlicher Menge aufgenommen wird. Allein schon die höhere Lagertemperatur für die letzten Wochen vor Durchführung der Versuche macht sich dabei ganz erheblich bemerkbar und steigert die Aufnahme um etwa das Neunfache. Die größte Menge gelangt jedoch, wie zu erwarten, dann in das Gewebe, wenn die Knollen in geschältem Zustand für 48 Std. bei einer Temperatur von 27°C im Brutschrank gelagert worden waren und einen Wasserverlust von etwa 10 % erlitten hatten.

b) Infiltration von Kartoffelknollengewebe ohne vorherige Wärmebehandlung

Zwischen den Ergebnissen dieses Versuches und der Hemmwirkung der gleichen Substanzen in vitro ist keine gute Übereinstimmung festzustellen (Abb. 17). Nur die mit Alkylarylsulfonat infiltrierten Proben zeigen die zu erwartende negative Beeinflussung des Pilzwachstums und der damit einhergehenden Gewebemazeration. Während bei Konzentrationen von 200 ppm die Ausbreitung des Pilzes zu

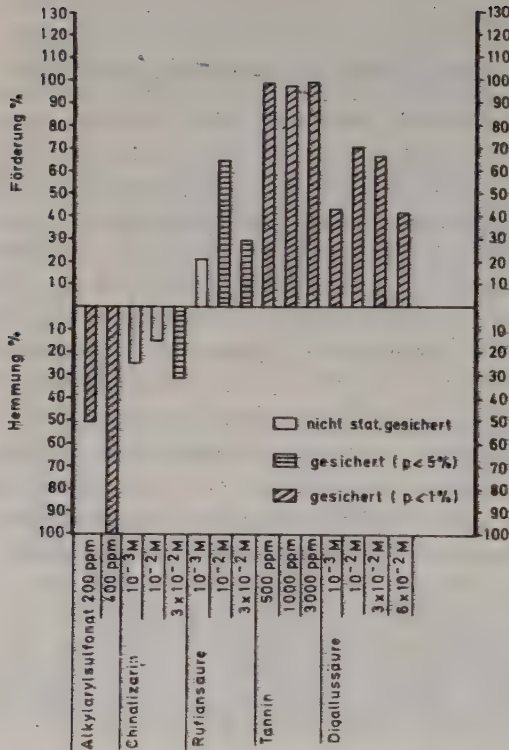


Abb. 17: Beeinflussung der Mazeration von Kartoffelgewebe durch vorherige Infiltration von Enzyminhibitoren (Knollen ohne Wärmebehandlung)

etwa 50 % gehemmt wird, ist bei einer Konzentration von 400 ppm überhaupt keine Pilzausbreitung und Gewebeerstörung mehr feststellbar.

Die Gewebezylinder sind noch sehr fest, wie zu Beginn der Inkubation; sie zeigen außer einer sehr leichten Grauerfärbung keine weiteren Symptome einer Schädigung. Die Un-

terschiede gegenüber den mit dest. Wasser infiltrierten Kontrollproben sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % statistisch sehr gut gesichert.

Bei Chinalizarin ist zwar auch in allen angewendeten Konzentrationen eine Hemmwirkung gegenüber der Ausbreitung und Mazeration zu erkennen, bei den Konzentrationen 10^{-3} M und 10^{-2} M schwanken die Werte jedoch erheblich und sind nicht statistisch zu sichern, lediglich bei 3×10^{-2} M ergibt sich eine signifikante Hemmung. Infolge der relativ schlechten Löslichkeit des Chinalizarins in Wasser setzt sich in den äußeren Gewebezonen durch deren filterartige Wirkung eine dünne Schicht ungelöster Substanzpartikel ab. Diese Schicht läßt sich auch durch anschließendes Spülen in sterilem dest. Wasser kaum entfernen; sie stellt vielmehr eine relativ harte Verfestigung dar und umschließt das nur wenig beeinflusste innere Gewebe röhrenförmig. Hieraus dürfte sich eine erhebliche Behinderung des Pilzes bei der Gewebebesiedlung ergeben.

Die geringste und statistisch nicht gesicherte Förderung geht mit etwa 20 % von Rufiansäure in einer Konzentration von 10^{-3} M aus. Durch Infiltration einer 10^{-2} molaren Lösung dieser Substanz wird eine Förderung der Mazeration des Gewebes gegenüber der Kontrolle von über 60 % hervorgerufen. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf das Dreifache bewirkt jedoch keine zusätzliche Steigerung, sondern vergleichsweise wieder eine Verminderung der Mazeration (Abb. 17 u. 18). Eine noch stärkere Förderung der Mazeration gegenüber der Kontrolle wird durch die Infiltration von Tannin hervorgerufen. Die drei gewählten Konzentrationen unterscheiden sich dabei kaum in ihrem Effekt.

Bei Digallussäure zeigt sich eine ähnliche Erscheinung wie bei Rufiansäure. Eine Konzentrationserhöhung von 10^{-3} M auf 10^{-2} M ergibt eine Intensivierung, jedoch führt eine weitere Konzentrationssteigerung keine Beschleunigung der Mazeration mehr herbei, vielmehr ist nun eine abnehmende Tendenz zu erkennen.



Abb. 18:

Mazeration von Kartoffelgewebe ohne vorherige Wärmebehandlung. Von links nach rechts: dest. Wasser, 10^{-2} M Rufiansäure, 3×10^{-2} M Rufiansäure.

c) Infiltration der Lösungen in Gewebe wärmebehandelter Knollen

Die Wasserverluste der für 48 Std. bei 27°C im Brutschrank offen gelagerten geschälten Knollen betrugen im Mittel 9,8 %. Entsprechend dieser Austrocknung erschien das Gewebe der auf diese Weise behandelten Knollen deutlich poröser als das solcher Knollen, die ohne eine derartige Vorbehandlung sofort nach dem Schälen weiterverarbeitet wurden.

Bei Infiltration von Alkylarylsulfonat und Chinalizarin in Gewebezylinder aus dem stärker ausgetrockneten Gewebe ergab sich im Hinblick auf die Mazeration für beide Substanzen in etwa die gleiche Wirkung wie im vorherigen Versuch. Infiltrationen von Rufiansäure bedingen gegenüber dem Versuch mit Gewebe ohne vorherige Wärmebehandlung hingegen eine völlig entgegengesetzte Wirkungsweise,

zumindest bei den beiden höheren Konzentrationen. Bei Infiltration einer 3×10^{-2} molaren Rufiansäure-Lösung wird die Entwicklung des Pilzes fast vollkommen unterbunden (Abb. 19 u. 20).

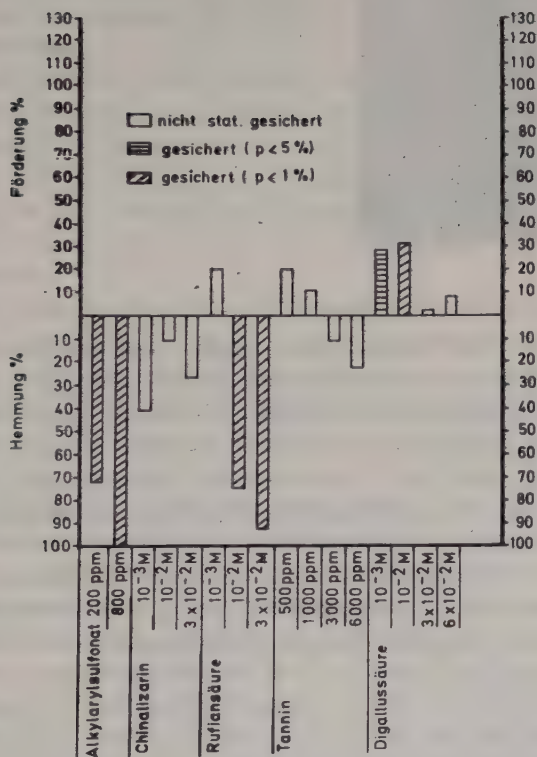


Abb. 19: Beeinflussung der Mazeration von Kartoffelgewebe durch vorherige Infiltration von Enzyminhibitoren. (Knollen nach Wärmebehandlung).



Abb. 20:

Einfluß der Infiltration
von Rufiansäure auf die
Mazeration von Kartoffel-
gewebe (Knollen nach Wär-
mebehandlung).

Von links: Kontrolle,
 10^{-2} M Rufiansäure, 3×10^{-2} M
Rufiansäure.

Die Infiltration von Tanninlösung bewirkt bei Konzentrationen von 500 und 1000 ppm eine Steigerung, bei 3000 und 6000 ppm eine mit der Konzentration parallel gehende Hemmung, die jedoch gegenüber der Kontrolle statistisch nicht gesichert ist.

Die Tendenz einer mit zunehmender Konzentration der infiltrierten Lösung geringer werdenden Förderung der Mazeration ist auch bei Digallussäure zu erkennen, ohne daß jedoch, wie bei Rufiansäure und Tannin, die Förderung bei der höchsten Konzentration in eine Hemmung umschlägt.

2. Versuche mit Bohnenhypokotylen

a) Einfluß der Vorkultur des Inokulums, der Vorbehandlung der Hypokotyle und der rel. Luftfeuchtigkeit auf die Mazeration

In Vorversuchen mit nichttetiolierten, im Gewächshaus angezogenen Bohnenpflanzen und deren Beimpfung mit auf Malz-Agar gewachsenem Myzel war eine ursprünglich zur Oberflächensterilisation gedachte Behandlung der Hypokotylabschnitte mit 70 %igem Alkohol die Voraussetzung dafür, daß überhaupt ein meßbarer Befall des Gewebes durch den Pilz erfolgte. Die Abänderung der Versuchsbedingungen dahingehend, daß eine unter Lichtabschluß und damit zu starker Vergeilung der Pflanzen führende Anzucht vorgenommen wurde, brachte eine deutliche Befallsverbesserung, die jedoch für weitere Versuche als noch zu gering erschien.

Im vorliegenden Versuch zeigte sich, daß eine Vorkultur des Inokulums auf Bohnen-Malz-Agar gegenüber dem bisher als Medium dienenden Malz-Agar und zwei weiteren zum Vergleich verwendeten Nährböden den Infektionserfolg erheblich verbessert. Durch Erhöhung der rel. Luftfeuchtigkeit während der Inkubation auf etwa 95 % konnte dieser noch weiter gesteigert werden (Abb. 21). Die positive Wirkung einer Alkohol-Vorbehandlung auf die Mazeration ist zwar auch unter diesen Bedingungen zu beobachten, die Werte bei den nichtbehandelten Proben nach Beimpfung mit auf BMA gewachsenem Inokulum liegen jedoch so hoch, daß diese Maßnahme bei den weiteren Versuchen unterbleiben konnte, zumal sie offensichtlich zu einer gewissen Schädigung des Gewebes führte. Wie zudem aus den Befallsdaten des folgenden Versuchs (Abb. 22) hervorgeht, wird auch durch die Applikation der Lösungen in die Gewebe deren Mazeration noch gefördert.

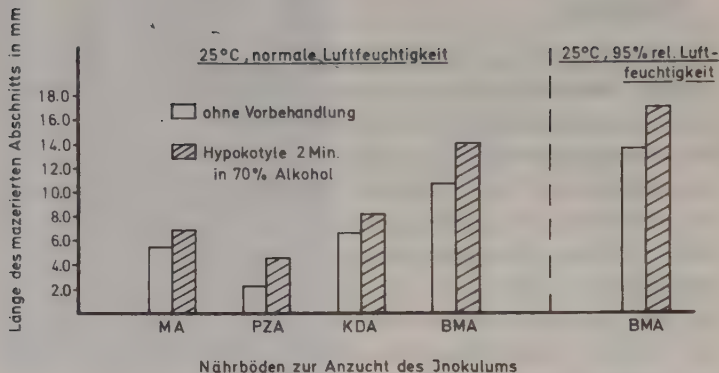


Abb. 21: Mazeration etiolierter Bohnenhypokotyle in Abhängigkeit von
a) der Vorkultur des Inokulums
b) einer Vorbehandlung der Hypokotyle mit 70 %igem Alkohol
c) der rel. Luftfeuchtigkeit während der Inkubation
(MA = Malz-Agar; PZA = Pektin-Zellulose-Agar;
KDA = Kartoffel-Dextrose-Agar; BMA = Bohnen-Malz-Agar).

b) Einfluß der Temperatur auf die Mazeration

Auf infiltriertem Bohngewebe ist während der ersten beiden Tage eine optimale Ausbreitung des Pilzes bei 27°C festzustellen (Abb. 22). Die Zuwachsrates sinkt denn jedoch etwas ab, wahrscheinlich wegen der zu diesem Zeitpunkt zu beobachtenden leichten Erschlaffung des Gewebes. Bei 24°C inkubierte Proben zeigen zwar in den ersten beiden Tagen ein geringeres Myzelwachstum, das Gewebe bleibt hier

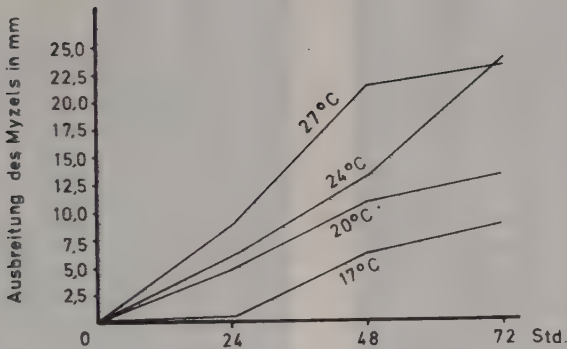


Abb. 22: Myzelentwicklung auf 7 Tage alten Bohnenhypokotylen in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur nach Infiltration von dest. Wasser.

aber etwas frischer, so daß am dritten Tage die gleichen Werte erreicht werden wie bei 27°C. Bei 20°C waren zwar die Gewebe, ebenso wie die bei 17°C inkubierten, auch am Versuchsende noch sehr turgeszent. Das Myzelwachstum ist jedoch derart gering, daß diese Temperaturen für die weiteren Versuche nicht mehr angewendet wurden.

c) Infiltration etiolierter Bohnenhypokotyle

Alkylarylsulfonat zeigt in diesen Versuchen (Abb. 23 - 25) in einer Konzentration von 200 ppm keine Wirkung. Der auch in den Versuchen mit Kartoffelgewebe zu beobachtende Hemmeffekt wird jedoch bei Infiltration einer Lösung von 400 ppm signifikant, bei 2000 ppm hoch signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

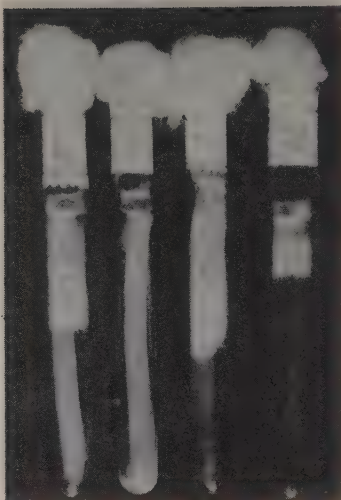


Abb. 23:

Mazeration etiellierter Bohnenhypokotyle nach Infiltration von Enzyminhibitoren (von links: Kontrolle, 10^{-2} M F 461, 10^{-1} M Rufiansäure)

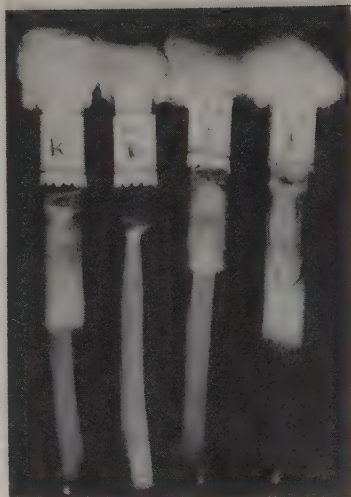


Abb. 24:

Mazeration etiellierter Bohnenhypokotyle nach Infiltration von Enzyminhibitoren (von links: Kontrolle, 2.000 ppm Alkylarylsulfonat, 5×10^{-2} M Chinalizarin, 10^{-1} M Digallussäure)

Der hemmende Einfluß der Rufiansäure ist bereits bei einer Konzentration von 10^{-2} M gesichert; er verstärkt sich mit der Infiltration höherer Konzentrationen von 5×10^{-2} M und 10^{-1} M.

Die Applikation von Chinalizarin hemmt die Mazeration dagegen nur unwesentlich, sowohl in einer Konzentration von 10^{-2} M als auch in einer solchen von 5×10^{-2} M.

Auch in diesem Versuch wird, ähnlich wie in dem mit Kartoffelgewebe ohne vorherige Wärmebehandlung durchgeführten, durch die Infiltration von Digallussäure und Tannin eine deutliche Stimulation des Pilzwachstums und der Ge-

webemazeration hervorgerufen. Während bei Digallussäure in Konzentrationen von 10^{-3} M und 10^{-2} M der Effekt nur sehr gering und gegenüber der Kontrolle statistisch nicht gesichert ist, ergibt sich bei Infiltration einer Konzentration von 5×10^{-2} M eine signifikante Förderung. Einer

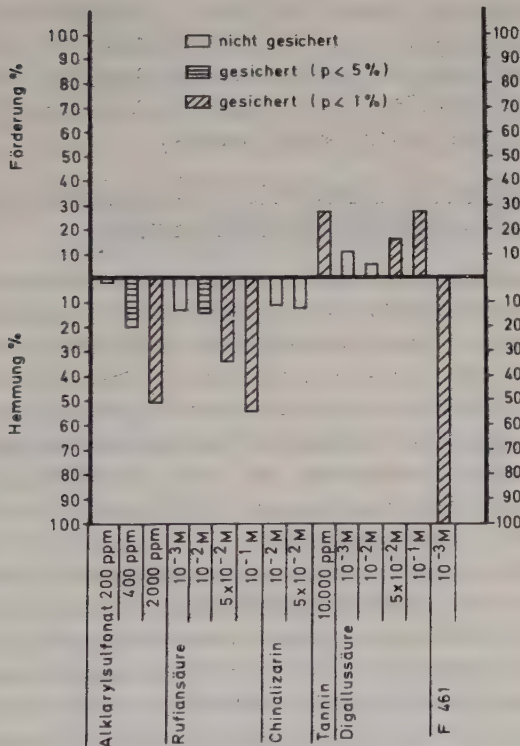


Abb. 25: Beeinflussung der Mazeration etiolierter Bohnenhypokotyle durch vorherige Infiltration von Enzyminhibitoren.

Konzentrationserhöhung auf 10^{-1} M geht eine weitere Steigerung der Mazeration parallel.

Die Infiltration von 10.000 ppm Tannin ergibt etwa die gleiche prozentuale Förderung wie die von 10^{-1} M Digallussäure.

Eine vergleichsweise in die Hypokotyle infiltrierte Lösung eines Wirkstoffs mit der Bezeichnung "F 461" (= 2,3 Dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin-4,4 dioxid), der als Fungizid mit systemischer Wirkung gegen Basidiomyzoten bekannt ist (vgl. v. SCHMELING und KULKA 1966), verhindert in einer Konzentration von 10^{-3} M jegliche makroskopisch wahrnehmbare Ausbreitung des Pilzes auf dem Gewebe; 5×10^{-4} molare Verabreichung führt noch zu einer mehr als 75 %igen Hemmung.

d) Resorption der Hemmstoffe durch Einstellen abgeschnittener Keimpflanzen in deren Lösungen

Eine zunächst vorgesehene Zuführung der gelösten Substanzen über die intakte Wurzel erwies sich als ungeeignet. Zwar zeigten unter sorgfältigster Vermeidung stärkerer Wurzelbeschädigungen aus dem Boden entnommene Pflanzen nach 24 stündigem Einstellen in 10^{-2} M Rufiansäure eine sehr schwache Rotfärbung des fast weißen Gewebes, vor allem aber der Gefäßbahnen, für eine Beeinflussung der Mazeration war die aufgenommene Konzentration offensichtlich jedoch zu gering. Höhere Konzentrationen des Inhibitors und längere Verweildauer der Pflanzen in demselben führten zu deutlichen Welkeschäden.

Ob eine Aufnahme der übrigen Hemmstoffe unter diesen Bedingungen erfolgte, konnte nicht festgestellt werden; eine Beeinflussung der Mazeration war auch hier nicht zu erkennen. Um die Aufnahme einer möglichst großen Menge der gelösten Präparate in die Pflanzen zu erreichen, wurde im folgenden Versuchsabschnitt bei allen Pflanzen die gesamte Wurzel unmittelbar über dem Boden abgeschnitten. Nach 20-24stündigem Einstellen dieser Keimlinge bei

27° C in die Lösungen - etwa 3 - 4 cm des unteren Hypokotylteils waren mit den Lösungen in direktem Kontakt - zeigte das Gewebe einschließlich der Kotyledonen bei Aufnahme der Rufiansäure eine sehr intensive Rotfärbung. Eine Konzentration von 10^{-3} M wurde dabei ohne nennenswerte Beeinflussung der Pflanzen von diesen vertragen.

Das Einstellen derselben in 10^{-2} M Rufiansäure führte hingegen zu stärkeren Welkeschäden. Vermutlich kann die bei Applikation dieser Konzentration zu beobachtende Förderung der Mazeration hierauf zurückgeführt werden. Bei Einstellen in Tannin- oder Digallussäurelösung verfärbt sich das Gewebe grau, so daß auch hier eine stärkere Resorption angenommen werden kann. Bei höheren Konzentrationen als 10^{-3} M bei Digallussäure und 1000 ppm bei Tannin bleiben die Pflanzen deutlich kleiner als die entsprechenden, in dest. Wasser eingestellten Kontrollpflanzen. Ob und in welchem Maße Chinalizarin in Anbetracht seiner Schwerlöslichkeit in die Pflanzen aufgenommen wird, kann aus den Befunden dieses Versuches nicht geschlossen werden, da die Pflanzen keinerlei Symptome zeigten.

Die in allen bisherigen Versuchen zu beobachtende ausgeprägte Mazerationshemmung durch Alkylarylsulfonat ist auch hier zu erkennen (Abb. 26). Rufiansäure zeigt, ebenso wie Chinalizarin, keine gesicherte Beeinflussung der Mazeration.

Die fördernde Wirkung des Tannins ist bei einer verabreichten Konzentration von 100 ppm nicht gesichert. Bei 500 ppm ist sie jedoch bereits signifikant und erhöht sich erheblich, wenn den Pflanzen 1000 bzw. 5000 ppm zugeführt werden. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Zuführung von Digallussäure. Auch hier ist eine kontinuierliche Beschleunigung der Mazeration mit steigender Lösungskonzentration zu beobachten.

Daß die ganz erheblich die Mazeration der Gewebe durch den Pilz fördernde Wirkung der Digallussäure, wahrscheinlich auch des Tannins, in erster Linie von der aufgenommenen Menge bestimmt wird, wird auch durch einen abschließenden Versuch unterstrichen. Im Verlauf desselben

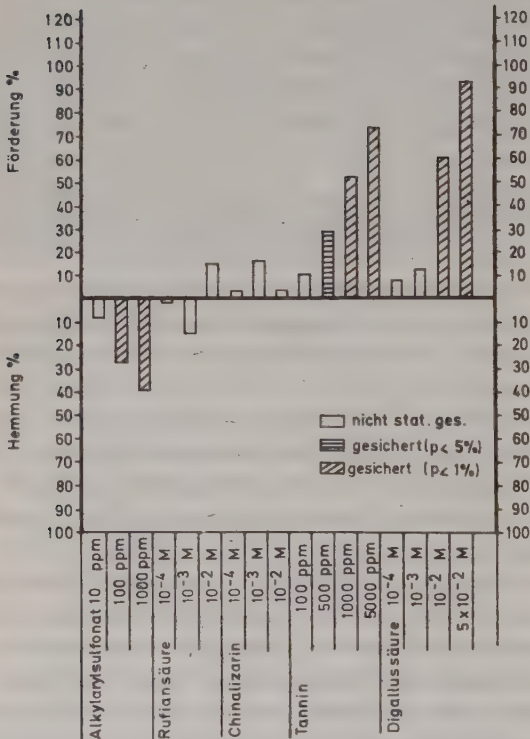


Abb. 26: Beeinflussung der Mazeration etiolierter Bohmenhypokotyle nach Resorption von Enzyminhibitoren durch Einstellen in Lösungen für 20 - 24 Std. bei 27°C.

wurden die Pflanzen zur Aufnahme der Lösungen in einen Brutschrank eingestellt, in dem die relative Luftfeuchtigkeit ein Maximum von 40 - 50 % nicht überschritt. Gegenüber den vorherigen Versuchen, bei denen die durch die Transpiration der Pflanzen sich erhöhende relative Luft-

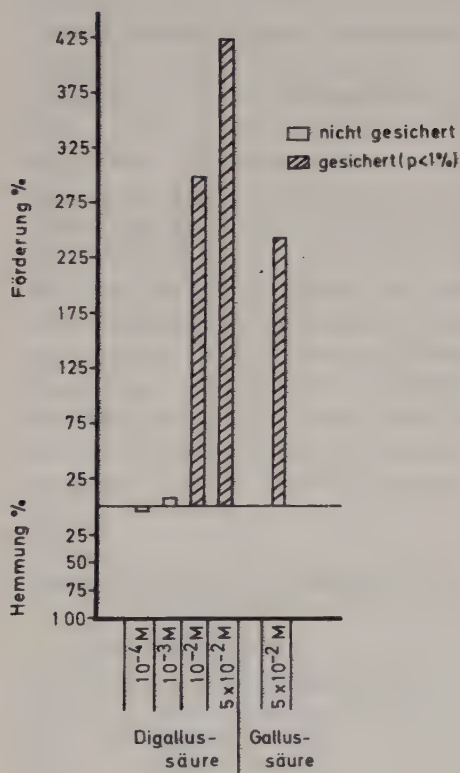


Abb. 27:

Beeinflussung der Mazeration etiolierter Bohnenhypokotyle nach Resorption von Digallussäure und Gallussäure durch 9stündiges Einstellen in Lösungen bei 27°C und 40 - 50 % rel. Luftfeuchtigkeit.

feuchtigkeit nicht reguliert wurde, wird unter diesen Bedingungen deutlich mehr Hemmstofflösung aufgenommen.

Das hat zur Folge, daß, nachdem die Pflanzen nur 9 Stunden in diesem Milieu gestanden hatten, die Mazeration durch Digallussäure gegenüber der Kontrolle um mehr als das Vierfache und damit wesentlich stärker als in den vorhergehenden Versuchen beschleunigt wurde (Abb. 27).

Gallussäure, in diesem Versuch vergleichsweise mit verabreicht, ist in ihrer Wirkungsweise der Digallussäure sehr ähnlich.

3. Versuche mit bewurzelten Keimpflanzen in Sandkultur

a) Vergleich der Pathogenität der Stämme C 7 und R-B auf Bohnenkeimlingen

Nach Abschluß der bisherigen Versuche an Bohnenhypokotylen, für die ausschließlich der auch für die Versuche in vitro verwendete Stamm R-B als Inokulum gedient hatte, zeigte sich, daß dieser Stamm für die nun vorgesehenen Gewächshausversuche nicht sehr gut geeignet war. So waren unter Gewächshausbedingungen angezogene und mit einer Myzelsuspension dieses Stammes inokulierte Bohnenkeimlinge nach 3 Tagen nur relativ leicht befallen. Außerdem war der Befall auch sehr unterschiedlich. Beide Faktoren gemeinsam bewirkten, daß Befallsunterschiede zwischen der unbehandelten Kontrollprobe und Pflanzen, denen einige der in vitro wirksamen Hemmstoffe über den Boden zugeführt worden waren, nicht genügend deutlich hervortraten.

Eine Variierung des Anzuchtmediums (Pektin statt Glukose als C-Quelle) und der Konzentration der zur Inokulation verwendeten Myzelsuspension verbesserten zwar die Befallsergebnisse, jedoch nicht in ausreichendem Maße.

Der vergleichsweise unter denselben Bedingungen angezogene und inokulierte Stamm C 7 erwies sich als wesentlich besser geeignet. Wie aus Tab. 7 hervorgeht, lagen die Befalls-

Tabelle 7: Befall 11 Tage alter Bohnenkeimlinge durch 2 Stämme von Rhizoctonia solani nach 3 Tagen

Stamm	Befallsindizes je Topf									Mittelwert
C 7	5,0	4,8	5,0	4,8	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,9
R-B	2,0	1,0	1,1	2,2	0,9	1,1	1,0	1,8	1,8	1,4

indizes dieses Stammes um mehr als das Dreifache über denen des Stammes R-B. Ein Wiederholungsversuch ergab in etwa die gleichen Relationen. Der Stamm C 7 wurde daher für die weiteren Gewächshausversuche als Inokulum verwendet.

b) Beeinflussung des Krankheitsbefalls an Pflanzen mit
Kotyledonen

Die Verabreichung der in vitro als Enzyminhibitoren wirksamen, relativ wenig fungitoxischen und in der angewendeten Konzentration nicht phytotoxischen Verbindungen über die Wurzeln konnte den Pilzbefall unter diesen Bedingungen nicht vermindern. Die Befallsindizes lagen bei allen Varianten auf einem nur wenig voneinander abweichenden mittleren Niveau (Tab. 8). Selbst das trotz seiner relativ hohen Toxizität gegenüber dem Pilz weiterhin mitverwendete, als Enzyminhibitor ausgezeichnet wirkende Alkylarylsulfonat, zeigt in Konzentrationen von 50 ppm keine Wirkung. In einer

Tabelle 8: Befallsindizes mit *Rhizoctonia solani* infizierter Bohnenkeimlinge nach Verabreichung von Enzyminhibitoren und dem Fungizid "F 461" über die Wurzeln (Kotyledonen nicht entfernt)

Mittel	Konz.	Index
Kontrolle	-	2,62
Digallussäure	$2 \times 10^{-3}M$	2,60
Tannin	2000 ppm	2,10
Rufiansäure	$10^{-3}M$	2,67
Chinalizarin	$10^{-2}M$	2,34
Alkylarylsulfonat	50 ppm	2,42
	75 ppm	1,43
F 461	$10^{-4}M$	1,73

GD 5 % = 0,55

GD 1 % = 0,72

Konzentration von 75 ppm ist hier zwar eine signifikante Befallsminderung zu beobachten, jedoch zeigen die mit dieser Konzentration behandelten Pflanzen gegenüber denen der übrigen Varianten einen eindeutig niedrigeren Wuchs. Zudem besteht die Möglichkeit, daß durch die Applikation dieser fungitoxischen Substanz schon vor der Infektion

eine Anreicherung in der Nähe des Wurzelhalses erfolgte, so daß das Inokulum auch unmittelbar beeinflußt werden konnte. Die gleiche Wirkungsweise kann wohl auch für das Fungizid "F 461" angenommen werden, das in diesem Versuch den Pilzbefall ohne wahrnehmbare Pflanzenschädigung hochsignifikant reduzierte.

Chinalizarin erwies sich als ganz besonders wenig phytotoxisch. Obwohl sich bei der hier verwendeten Konzentration von 10^{-2} M die Substanz in der oberen Wurzelzone sehr stark anreicherte, war keine negative Beeinflussung der Testpflanzen zu beobachten. Selbst durch die in Vorversuchen verabreichte Konzentration von 5×10^{-2} M wurde eine solche, wahrscheinlich infolge der geringen Löslichkeit, nicht hervorgerufen.

c) Beeinflussung des Krankheitsbefalls an Pflanzen ohne Kotyledonen

Das Entfernen der Keimblätter am 5. Tag nach dem Auslegen der Samen, zu einem Zeitpunkt, in dem die ersten Laubblätter bereits entfaltet waren, hatte keine äußerlich wahrnehmbare negative Reaktion der Pflanzen zur Folge. Infolge der Verabreichung von Nährlösung erschienen die Pflanzen etwa ab dem 9. Tag sogar deutlich besser entwickelt als Pflanzen mit Kotyledonen, denen jedoch keine zusätzlichen Nährstoffe verabreicht worden waren. Eine negative Beeinflussung der Pflanzen durch die Hemmstofflösungen war hier nicht zu beobachten. Da die Zuführung derselben erst vom 4. Tage ab erfolgte, wurde auch Alkylarylsulfonat in einer Konzentration von 75 ppm ohne phytotoxische Schäden vertragen.

Trotz der Verdünnung des Inokulums gegenüber der vorherigen Versuchsreihe lagen die Befallsindizes der Kontrolle wesentlich höher als in dem vorherigen Versuch an Pflanzen mit Kotyledonen.

Tabelle 9: Einfluß in vitro wirksamer Enzyminhibitoren auf den Rhizoctonia-Befall von Bohnenpflanzen nach vorherigem Entfernen der Kotyledonen

Mittel	Konz.	Bef.Ind.
Kontrolle	-	3,68
Tannin	2000 ppm	3,35
Digallussäure	$2 \cdot 10^{-3}$ M	3,40
Rufiansäure	10^{-3} M	2,41
Chinalizarin	10^{-2} M	2,62
Alkylarylsulfonat	75 ppm	2,58

GD 5 % = 0,53

GD 1 % = 0,69

Auch in diesem Versuch wird der Pilzbefall durch Tannin und Digallussäure nicht beeinflusst (Tab. 9). Rufiansäure ist demgegenüber, im Gegensatz zur Applikation bei Pflanzen mit Kotyledonen, hier eindeutig wirksam. Ihre befallsmindernde Wirkung ist gegenüber der Kontrolle hochsignifikant. Chinalizarin zeigt etwa die gleiche gute Wirkung. Ähnliches gilt bei dieser Versuchsanstellung auch für Alkylarylsulfonat.

D. DISKUSSION

=====

Das in den vorliegenden Untersuchungen während der ersten Entwicklungsstadien des Pilzes zu beobachtende leichte Absinken des pH-Wertes der Nährlösung (Abb. 9) wurde auch von PAPAIVAS und AYERS (1965) bei Kultur des Pilzes auf Czapek's Nährmedium mit einem Ausgangs-pH-Wert von 5,0 festgestellt. Es scheint hier eine Parallele zu ähnlichen Beobachtungen in vivo zu bestehen, denn in den Untersuchungen von BARKER und WALKER (1962) an *Rhizoctonia*-infizierten Pflanzen zeigte sich in den ersten Stadien der Pilzeinwirkung auf das Pflanzengewebe die gleiche Erscheinung. HANCOCK (1966) stellte während der Pathogenese von Sclerotinia sclerotiorum auf Sonnenblume und Tomaten ebenfalls eine Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration fest. Die genannten Autoren vermuten, daß diese dadurch hervorgerufen wird, daß die in dem höheren pH-Bereich einsetzende Wirkung der Pektinmethylesterase aus den pektischen Substanzen Carboxylgruppen freisetzt, wodurch sich der pH-Wert zunächst in einen für die Einwirkung der PG günstigeren Bereich verschiebt. Eine zusätzliche Beteiligung vom Pilz ausgeschiedener organischer Säuren bei dieser pH-Wert-Erniedrigung des Substrates scheint ebenfalls nicht ganz ausgeschlossen. So nehmen beispielsweise AOKI und seine Mitarbeiter (1963) an, daß Rhizoctonia solani zur Bildung von Phenylelessigsäure befähigt ist, die später zu toxischen Hydroxyderivaten metabolisiert wird. Die Bildung von Oxalsäure als wichtiger Faktor beim Substratabbau wird bei einigen Organismen vermutet (LYR 1959a), bei anderen ist sie nachgewiesen (BATEMAN und BEER 1965); bei Rhizoctonia solani sind entsprechende Befunde jedoch bisher nicht beschrieben worden.

Die Gründe dafür, daß in unseren Untersuchungen die PG-Aktivität nicht, wie in den bisherigen Veröffentlichungen anderer Autoren angegeben (NOUR EL DEIN und SHARKAS 1963, SHERWOOD 1966), bereits zwischen dem 5. und dem 7. Tag,

sondern erst 13 Tage nach der Inokulation ihr Maximum erreicht, wurden nicht näher untersucht. Es ist jedoch anzunehmen, daß der pH-Wert in den Versuchen der genannten Autoren während der Anzucht des Pilzes sehr schnell auf über 7,0 ansteigt und dadurch, wie bereits in der Einleitung vermutet, eine relativ frühzeitige Beendigung der PG-Synthese bewirkt.

In den eigenen Versuchen verhinderte die Zugabe des 0,2 M Phosphatpuffers in die Nährlösung derartige pH-Wert-Veränderungen weitgehend. Auf diese Weise bleibt die für die Synthese sowohl der PG als auch des C_x -Enzyms geeignete Wasserstoffionenkonzentration über den gesamten Versuchszeitraum erhalten. Die Zeitspanne für die Bildung beider Enzyme verlängert sich damit, wodurch sich dieselben auch stärker anzureichern scheinen, wie aus Vergleichen der in RA-Binheiten ausgedrückten Aktivität der Kulturfiltrate mit der von anderen Autoren in ungepufferten Medien erzielten hervorgeht (vgl. SHERWOOD 1966, BATEMAN 1963a).

Außer dieser für enzymatische Untersuchungen sehr wünschenswerten höheren Enzymausbeute erscheint auch der Umstand, daß bei Verwendung des Puffers in der Nährlösung die maximale Enzymaktivität für längere Zeit relativ konstant bleibt, für vergleichende Untersuchungen der Enzymaktivität unterschiedlich pathogener Organismen sehr vorteilhaft. Dies gilt in erster Linie dann, wenn sich die Aktivitätswerte der Medien sehr schnell verändern, die Messungen jedoch in relativ großen Zeitabständen oder nur einmalig vorgenommen werden. Weiterhin dürften sich auch kleinere Enzymmengen, die überhaupt nur zum Zeitpunkt ihrer maximalen Aktivität erfaßbar sind, auf diese Weise leichter nachweisen lassen.

Widersprüchliche Befunde über die Bildung als adaptiv bekannter Enzyme nach Anzucht der Organismen auf Substraten, welche die als Induktoren im Sinne der Hypothesen von JACOB und MONOD (vgl. BRESCH 1964) erforderlichen

C-Quellen nicht enthielten, können wahrscheinlich zu einem großen Teil auf die in ungepufferten Medien zu beobachtenden Schwankungen zurückgeführt werden. In den vorliegenden Versuchen konnte bei allen verwendeten C-Quellen deutlich meßbar sowohl PG- als auch C_x -Aktivität nachgewiesen werden, auch wenn die für die entsprechende Enzyminduktion geeignete C-Quelle in Substrat nicht vorhanden war. Zu gleichen Ergebnissen kam WOOD (1961), der für Verticillium ebenfalls PG-Aktivität auf Glukose oder CMC nachgewiesen hat. STRIDER und WINSTEAD (1961) fanden bei Gladosporium cucumerinum eine C_x -Synthese ohne Zugabe von Zellulose, ebenso LYR (1959c) bei einem Teil der von ihm untersuchten holzerstörenden Pilze. Im Gegensatz hierzu konnten BATEMAN (1963a) sowie AYERS und Mitarbeiter (1966) bei Rhizoctonia solani und ABO-EL-DAHAB (1964) bei Xanthomonas malvacearum eine Enzymaktivität nur dann nachweisen, wenn die hierfür spezifische C-Quelle verabreicht worden war.

Erwähnt seien in diesem Zusammenhang auch noch die Arbeiten von HORTON und KEEN (1964, 1966), welche fanden, daß bei einer Verabreichung von 0,0005 M bzw. 0,005 M Glukose gemeinsam mit Pektin die PG-Aktivität gesteigert wurde. In Übereinstimmung mit den in Abb. 2 der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen und denen von SHERWOOD (1964) war jedoch bei Verabreichung höherer Glukosekonzentrationen die PG-Aktivität niedriger, als wenn Pektin als alleinige C-Quelle gegeben wurde. Hinsichtlich der Wirkung der Glukose auf die Zellulaseaktivität ergeben sich im Prinzip die gleichen Befunde.

Vergleichbare Untersuchungen über die Myzelbildung auf Pektin, CMC und Glukose, allein oder in verschiedenen Kombinationen, wie sie in diesem Zusammenhang ebenfalls durchgeführt wurden, scheinen bisher für Rhizoctonia solani nicht vorzuliegen. Bei einem Vergleich mit den Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen von LYR (1959a, b, c, 1960) an

holzerstörenden Pilzen, von FISHER (1965) an einer Fusarium-Art und von HORTON (1964) ergibt sich eine Übereinstimmung mit den Befunden von FISHER und HORTON insofern, als auf CMC die geringste Myzelmasse gebildet wird. In den übrigen Fällen zeigen sich hingegen deutliche Unterschiede in der Wirkung der verwendeten Substanzen auf die Myzelbildung bei den untersuchten Organismen. Die Reihenfolge der verwendeten C-Quellen, geordnet nach der Höhe der mit ihnen bei alleiniger Verabreichung erzielten Myzeltrockengewichte, lautet bei LYR: Pektin, Zellulose, Glukose; bei FISHER und HORTON: Pektin, Glukose, Zellulose; und in den eigenen Untersuchungen: Glukose, Pektin und Zellulose.

Die Erwägungen von LYR (1959c) über eine unökonomische Verwertung der Glukose, eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung durch den bei Glukoseverabreichung vorhandenen Nährstoffüberschuß oder auch über eine zusätzliche Verwertbarkeit der bei der Spaltung der Zellulose und des Pektins freiwerdenden Bindungsenergie scheinen somit zumindest für Rhizoctonia solani nicht zuzutreffen. Vergleicht man die auf den verwendeten C-Quellen erzielten Enzymaktivitäten mit den entsprechenden Myzeltrockengewichten, so scheint sich vielmehr die von LYR (1959a) in einem anderen Zusammenhang gemachte Erfahrung zu bestätigen, daß Ektoenzym- und Myzelbildung einander nicht entsprechen, vielmehr eher in einem reziproken Verhältnis zueinander stehen. Dies entspricht im Prinzip der Grundhypothese von MANDELSTAM, daß Proteine und Enzyme aus einem gemeinsamen Pool gebildet werden (vgl. hierzu HOFFMANN-OSTENHOF 1954). Hiernach dürften hohe Myzeltrockengewichte dort am ehesten zu erwarten sein, wo der Pilz nicht gleichzeitig zur Bildung für den Substrataufschluß erforderlicher Enzyme genötigt ist.

Zur Diskussion der Ergebnisse über die Hemmwirkung verschiedener Substanzen auf die PG-, PME- und C_x -Aktivität von Rhizoctonia solani bietet sich keine Vergleichsmöglich-

keit mit den Arbeiten anderer Autoren, da über derartige Untersuchungen bei diesem Pilz bisher kaum Veröffentlichungen vorzuliegen scheinen. BATEMAN (1963b, 1964a) hat lediglich festgestellt, daß die divalenten Ca-, Mg- und Ba-Ionen die Hydrolyse von Na-Polypektat durch die PG hemmen, monovalente Ionen hingegen unwirksam sind.

Mit pektischen und zellulolytischen Enzymen anderer Mikroorganismen sind hingegen eine ganze Reihe von Hemmversuchen durchgeführt worden. Die dabei erzielten Ergebnisse stimmen im allgemeinen mit denen der eigenen Versuche recht gut überein. Daß einfache Phenole, wie aus den in Tab. 3 zusammengefaßten Ergebnissen hervorgeht, auf Pektinasen zum größten Teil keine Hemmwirkung ausüben, wurde beispielsweise auch von GROSSMANN (1962b, 1964) in Untersuchungen an pektischen Enzymen von Fusarium oxysporum f. lycopersici bzw. von Alternaria solani festgestellt. Während LYR (1961) hinsichtlich der Wirkung der Gallussäure auf Pektinasen von Coniophora cerebella zu einem ähnlichen Ergebnis kommt, zeigt sich in seinen Versuchen bei Anwendung von Phenol eine deutliche Hemmwirkung.

Die in den zitierten Versuchen von GROSSMANN in geringem Maße als Inhibitoren wirksamen Acridin-Derivate Trypaflavin und Rivanol führten in den vorliegenden Versuchen zu Niederschlägen mit dem Reaktionsmedium und konnten daher nicht geprüft werden.

Aus der Gruppe der Chinone zeigen Benzochinon, 2-Methyl-1,4-Naphthochinon (= Menadion), Natrium-1,2-Dioxyanthrachinonsulfonat und 1,2,5,8-Tetraoxyanthrachinon eine besonders gute Übereinstimmung in ihrer Hemmwirkung mit den Untersuchungsergebnissen des genannten Autors. 1,4-Dioxyanthrachinonsulfonsäure war hingegen deutlich weniger, Na-β-Naphthochinonsulfonat ebenso deutlich besser wirksam. Der beachtliche Hemmeffekt der letztgenannten in Wasser relativ schwer löslichen Substanz zeigt sich jedoch nur, sofern das Präparat mit einem Ultra Turrax-Gerät möglichst intensiv in der Flüssigkeit suspendiert worden ist.

Tannin (Acidum tannicum puriss. leviss. clare solubile "Merck") verursachte in den vorliegenden Versuchen zwar eine erhebliche PG-Hemmung, jedoch war diese nicht ganz so deutlich wie in den Versuchen von LYR (1961) und GROSSMANN (1962b). Digallussäure, ein Bestandteil des Tannins (KLAGES 1958, HASLAM 1966) erwies sich als ein ausgezeichneter Inhibitor. Über ihre überaus hohe Wirksamkeit gegenüber der PG scheinen bisher keine Veröffentlichungen vorzuliegen. Ähnliches gilt für die PG-Hemmung durch einige Thiocarbamate wie Zink-äthyl-bis-dithiocarbamat, Fe-dimethyl-dithiocarbamat und für Na-dimethyl-dithiocarbamat, von denen besonders die beiden ersten eine beachtliche Hemmwirkung zeigen. Auch hier muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Inhibitorwirkung dieser Substanzen wesentlich vom Grad der Suspendierung in der Flüssigkeit beeinflußt wird.

Über den Einfluß von Detergentien auf den Abbau organischer Stoffe ist u. a. von BÜHSE (1965) berichtet worden. Hingegen gibt es wenig Beispiele für Untersuchungen ihres Einflusses auf die Hemmung sowohl der pektischen als auch der zellulolytischen Enzyme in vitro. Einige unter den Bezeichnungen Tween, Span oder Triton im Handel befindliche Substanzen dieser Gruppe erwiesen sich in den vorliegenden Versuchen als völlig unwirksam (vgl. auch WAGGONER u. DIMOND 1955), so daß sie nicht eingehender diskutiert zu werden brauchen. Die Hemmwirkung des sowohl gegenüber den pektischen als auch den zellulolytischen Enzymen allen in dieser Arbeit getesteten Substanzen überlegenen Alkylarylsulfonats, eines ebenfalls den Detergentien zuzurechnenden Präparates, wurde bereits von KERTESZ (1951) erwähnt. Sein hemmender Einfluß auf die Pektolyse ist etwas stärker als auf den enzymatischen Abbau der CMC, jedoch in beiden Fällen auch in Konzentrationen von 150 ppm noch sehr beträchtlich.

Die in den vorliegenden Untersuchungen sehr ausgeprägte Hemmwirkung des α -Naphthols auf die PG ist etwas höher als in den Versuchen von GROSSMANN mit Fus. oxysporum f. lycopersici, ebenso die des Semicarbazid-Hydrochlorids. Da sich in der Tendenz jedoch insgesamt eine recht gute Übereinstimmung hinsichtlich des Effekts der miteinander vergleichbaren Substanzen auf die Enzyme der beiden Pilze ergibt, dürften die zu beobachtenden Abweichungen wahrscheinlich weniger artspezifischen Unterschieden als vielmehr versuchstechnischen Gründen zuzuschreiben sein. In diesem Zusammenhang sei nur kurz darauf hingewiesen, daß die Versuche mit weitgehend ungereinigten Enzympräparaten durchgeführt wurden, so daß eventuelle Reaktionen der Inhibitoren mit den Begleitstoffen, je nach dem Anteil letzterer, das Versuchsergebnis unterschiedlich stark beeinflussen können.

SH-Inhibitoren zeigten sowohl gegenüber der PG als auch der Zellulase eine sehr unterschiedliche Wirksamkeit. So bewirkt p-Chlormercuribenzoessäure in einer Konzentration von 10^{-2} M bei beiden Enzymen übereinstimmend mit den Untersuchungen von LYR (1961) eine beträchtliche Hemmung, Maleinsäure in der gleichen Konzentration ist jedoch völlig unwirksam, wie auch von GROSSMANN (1962b) im Hinblick auf die PG-Hemmung festgestellt wurde.

Die Hemmung der PG durch Metallsalze soll nicht im einzelnen diskutiert werden. Es sei nur hervorgehoben, daß die Quecksilber-, Silber- und Kupferverbindungen alle übrigen in ihrer Wirksamkeit weit übertreffen und daß demgegenüber alle Alkalimetallsalze überhaupt keinen Effekt zeigen. Die Ergebnisse decken sich in etwa mit Untersuchungen von CORDEN et al. (1964) über die Hemmung einer PG von Fusarium oxysporum f. lycopersici.

Die Hemmung der Zellulase (C_x) durch SH-Inhibitoren und Detergentien wurde bereits im Zusammenhang mit deren Einfluß auf die Pektolyse diskutiert. Wenn man die in der Tab.3 nebeneinander aufgeführten Ergebnisse der PG- und C_x -

Hemmversuche miteinander vergleicht, so läßt sich unschwer feststellen, daß die Inhibitorwirkung der Substanzen auf beide Enzyme in der Regel so gut übereinstimmt, daß kaum von einem enzymspezifischen Einfluß gesprochen werden kann. Etwas unterschiedlich ist die Wirkung des Pyrogallols, welches gegenüber der PG eine leichte Hemmung erkennen läßt, im Hinblick auf die Zellulase jedoch wie alle übrigen einfachen Phenole völlig unwirksam ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen von LYR (1961) an einer Zellulase von Fomes marginatus und von GROSSMANN (1967) an einer solchen von Fusarium oxysporum f. lycopersici überein (vgl. hierzu auch NORKRANS 1963). Digallussäure und Tannin, welche beide die Aktivität der Zellulase im Gegensatz zu der von PG fast vollkommen hemmen, erwiesen sich auch in den erwähnten Versuchen von GROSSMANN (1967) als ausgezeichnete Inhibitoren. Eine besonders gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des genannten Autors ergibt sich auch hinsichtlich der festgestellten starken Zellulasehemmung durch α -Naphthol, Benzochinon und die Carbamate, wobei die in den eigenen Versuchen zu beobachtende deutlichere Wirkung des in Wasser sehr schwer löslichen Fe-dimethyl-dithiocarbamats wohl wiederum auf die bessere Suspendierung mit Hilfe des Homogenisators zurückzuführen ist. Andere Autoren erzielten mit Carbamaten sehr unterschiedliche Ergebnisse. So konnten HUSAIN und RICH (1958) gegenüber Zellulasen von Gladosporium cucumerinum keine Hemmung nachweisen. Nach MANDELS und REESE (1963) hemmen Zink- und Natrium-äthylen-bis-dithiocarbamat die Zellulasen von Trichoderma viride und Myrothecium verrucaria, jedoch nicht diejenige von Pestalotiopsis westerdijkii. Die von MANDELS und REESE (1963) beschriebene ausgeprägte Zellulasehemmung durch Quecksilbersalze, gefolgt von Silber-, Kupfer- und Bleiverbindungen, wurde auch von GROSSMANN (1967) festgestellt; die Befunde stimmen mit den eigenen Untersuchungen sehr gut überein. Welche Möglichkeiten der Einwirkung

der einzelnen Substanzen auf das Enzym zur Erklärung des Inhibitoreffekts in Frage kommen, soll hier nicht näher diskutiert werden. Eine ausführlichere Erörterung dieser Fragen findet sich in der Arbeit von GROSSMANN (1967).

In Hemmversuchen, die FUCHS (1965) mit einer Pektinmethylesterase aus Pflanzenextrakten durchführte, erwiesen sich m-Digallussäure und Tannin als besonders gute Inhibitoren; die Wirksamkeit der 1,4-Dioxyanthrachinonsulfonsäure (Rufiansäure) war deutlich geringer. Auch in Untersuchungen HALLS (1966) zeigte Digallussäure eine ausgezeichnete Hemmwirkung gegen PME. Die mit diesen drei Verbindungen erzielten Ergebnisse stimmen mit den eigenen Untersuchungen über die PME von Rhizoctonia solani sehr gut überein. Daß Tannin und Rufiansäure auch auf eine PME von Fus. oxysporum f. lycopersici außerordentlich hemmend wirken, hat bereits GROSSMANN (1962b) gezeigt. Die Wirkung der letztgenannten Substanz lag in seinen Versuchen deutlich höher als in den eigenen und in denen von FUCHS (1965). Gegenüber der PME erweist sich Rufiansäure als besserer Inhibitor als gegenüber der PG und der Zellulase (C_x).

Die in den Versuchen über die Fungitoxizität beobachtete starke Wachstumshemmung durch Zn-äthylen-bis-dithiocarbamats ist nicht verwunderlich, da das Präparat ja auch als Fungizid verwendet wird. Die Toxizität der getesteten Chinonderivate ist sehr unterschiedlich, was nach den Untersuchungen von BRAUNE (1964) in den sehr vielfältigen Möglichkeiten des Eingriffs dieser Substanzen in den Zellstoffwechsel begründet sein dürfte.

Alkylarylsulfonat gehört zur Gruppe der Detergentien oder Tenside, in der Literatur auch als "Surfactants" bezeichnet, deren relativ hohe Toxizität gegenüber Mikroorganismen ebenfalls bereits mehrfach diskutiert worden ist (STEINER und WATSON 1965, VOSS 1965), Daß demgegenüber Tannin nur relativ wenig fungitoxisch ist, wurde auch

von GROSSMANN (1962d) festgestellt. Digallussäure verhält sich ähnlich wie das Tannin; es mag dies an der nahen chemischen Verwandtschaft beider Substanzen liegen. Die relativ geringe Fungitoxizität der Gallussäure (vgl. Tab. 5), einer einfachen phenolischen Verbindung, die als einer der Grundbausteine der beiden letztgenannten Substanzen anzusehen ist, verdient besondere Erwähnung im Hinblick auf die Interpretation einiger Ergebnisse der Versuche an Kartoffelgewebe und Bohnenhypokotylen.

Über die Beeinflussbarkeit der Aggressivität von Rhizoctonia solani durch die Vorkultur haben bereits HOFFERBERT und ORTH (1951) berichtet. ZOGG (1957) konnte bei Fußkrankheitserregern an Getreide ebenfalls eine solche Abhängigkeit nachweisen. DEESE und STAHMANN (1952) fanden, daß Fusarium oxysporum f. cubense Pflanzengewebe stärker mazerierte, wenn das verwendete Inokulum vorher statt auf Glukose auf Pflanzenteilen oder auf Pektin angezogen worden war. Auch auf Xanthomonas malvacearum scheint sich die Vorkultur auf Pektin im Gegensatz zu einer solchen auf Glukose pathogenitätssteigernd auszuwirken (ABO-EL-DAHAB 1964). Eine gleichzeitige Untersuchung des Einflusses der jeweiligen Vorkultur der Organismen auf ihre pektolytische und zellulolytische Aktivität scheint von den genannten Autoren jedoch nicht vorgenommen worden zu sein. Die diesbezüglichen eigenen Ergebnisse (Abb. 4 und 21) lassen erkennen, daß Enzymaktivität und Aggressivität durch eine unterschiedliche Vorkultur des Inokulums etwa gleichsinnig beeinflußt werden. Wenn dabei eine Aggressivitätssteigerung nach Vorkultur auf einem Pektin und Zellulose enthaltenden Agar nicht beobachtet werden konnte, so mag dies an der geringen Myzelbildung des Pilzes auf diesem Medium liegen. Man kann daher annehmen, daß eine generelle Aggressivitätssteigerung nach vorheriger Adaption des Inokulums an Pektin - wie sie aus den eingangs zitierten Arbeiten geschlossen werden könnte - nicht in allen Fällen zu erwarten ist. Sie scheint vielmehr nur dann einzutreten,

wenn die allgemeine Stoffwechselaktivität des Inokulums, für welche die Myzelbildung als Maß dienen kann, eine bestimmte Intensität nicht unterschreitet. Die gleiche Überlegung dürfte auch im Hinblick auf den Einfluß der Vorkultur auf die Enzymaktivität gelten.

Zur Applikation der Inhibitoren in vivo wurden drei verschiedene Verfahren angewendet;

1) Infiltration in Kartoffelknollengewebe bzw. Bohnenhypokotyle,

2) Resorption durch abgeschnittene Bohnenkeimlinge,

3) Zuführung über die Wurzeln von Bohnenkeimpflanzen.

Es ist anzunehmen, daß die Aufnahme und Verteilung der Hemmstoffe in der genannten Reihenfolge zunehmend erschwert und damit die effektive Konzentration im Gewebe geringer wird. Unterschiedliche Wirkungen einzelner Inhibitoren in Abhängigkeit von der Applikationsform dürften weitgehend auf solche Konzentrationsunterschiede zurückzuführen sein. Dagegen scheinen die Differenzen zwischen den verschiedenen geprüften Inhibitoren auf ungleichartigen Wirkungsmechanismen, teilweise vielleicht auch auf Veränderungen der Inhibitormoleküle beim Eintritt in das Pflanzengewebe, zu beruhen.

Die Tatsache, daß der hemmende Einfluß der Rufiansäure bei Infiltration in Kartoffelknollengewebe (nach Wärmebehandlung desselben) sowie in Gewebe etiolierter Bohnenhypokotyle sehr deutlich zu beobachten ist, läßt vermuten, daß bei dieser gleichsam mit Gewalt erzwungenen Aufnahme tatsächlich eine genügende Menge der Substanz in das Gewebe gelangt. Bei dieser Konzentration (vgl. auch Tab. 6) dürfte die Wirkung der Rufiansäure auf der Hemmung der pilzlichen Enzyme beruhen.

Das Aufsaugenlassen des gelösten Inhibitors durch etiolierte Bohnenkeimlinge scheint demgegenüber doch bereits eine so wesentliche Aufnahmeerschwerung darzustellen, daß die resorbierte Lösungsmenge für eine Hemmung der Mazeration nicht ausreicht. Da die Gefäßbündel der so behandelten

Keimlinge tiefrot verfärbt sind, dürfte weniger der Eintritt der Lösung in das Gefäßsystem als vielmehr der Übergang aus den Gefäßen in das Parenchym wesentliche Schwierigkeiten bereiten.

Bei der dritten Applikationsform, der Zuführung über die Wurzel, scheint die Wurzelbarriere die entscheidende Rolle dafür zu spielen, daß nur noch sehr geringe Mengen des Inhibitors in das Gewebe gelangen. Eine Verfärbung desselben kann daher im Gegensatz zu den beiden vorigen Applikationsformen nicht mehr beobachtet werden. Ein nicht unwesentlicher Grund für die geringe Aufnahme der Rufiansäure kann wohl auch darin gesehen werden, daß zum Zeitpunkt der Verabreichung die Nährstoffe weitgehend aus den Kotyledonen zur Verfügung gestellt werden. Das Entfernen der Kotyledonen dürfte demgegenüber die Pflanzen zu einer verstärkten Nährstoffaufnahme über die Wurzel veranlassen. Es ist anzunehmen, daß dabei auch gleichzeitig eine vergleichsweise größere Menge an Inhibitorlösung aufgenommen wird.

In diesem Zusammenhang sei ferner darauf hingewiesen, daß durch das Entfernen der Kotyledonen der Befall von Bohnenkeimlingen durch Rhizoctonia solani wesentlich verstärkt wird, wie dies auch von BATEMAN (persönliche Mitteilung) beobachtet werden konnte. HORTON und KEEN (1966) haben eine ähnliche Erscheinung beim Befall von Zwiebelwurzeln durch Pyrenochaeta terrestris näher untersucht. Aus ihren Befunden geht hervor, daß der relativ hohe Zuckergehalt der Wurzeln solcher Pflanzen, die ihren Nährstoffbedarf in erster Linie aus den leicht löslichen Vorräten der Kotyledonen decken - ähnlich wie eine reichliche Zuführung von Glukose in vitro - die Synthese von PG und Zellulase durch das Pathogen weitgehend verhindert. Dieser Effekt kann durch Besprühen der Keimblätter mit Glukose noch verstärkt werden. Werden die Kotyledonen hingegen entfernt, so wird, wegen des Fehlens ausreichender Mengen einfacher C-Verbindungen, infolge einer intensiveren Synthese lyti-

scher Enzyme das Gewebe verstärkt abgebaut. Wenn daher Rufiansäure in den vorliegenden Untersuchungen im Gewächshaus nur nach Entfernen der Kotyledonen eine deutliche Beeinträchtigung des Pilzbefalls bewirkte, so deutet dies die Möglichkeit an, daß ihre Wirkung auf einer teilweisen Blockierung der unter diesen Umständen einerseits besonders reichlich vom Pilz ausgeschiedenen, andererseits auch besonders dringend benötigten lytischen Enzyme beruht (vgl. auch FARKAS und KIRALY 1964).

GROSSMANN (1962 d), der die innertherapeutische Wirkung der Rufiansäure erstmals gegenüber Fusarium oxysporum f. lycopersici an Tomatenpflanzen nachgewiesen hat, hat einen solchen Wirkungsmechanismus dieser Substanz bereits in Erwägung gezogen. Vorerst ist jedoch nicht erwiesen, ob die von HORTON und KEEN aufgezeigten Zusammenhänge auch auf das Wirt-Parasit-Verhältnis von Rhizoctonia solani auf Bohnenkeimlingen zutreffen. Zweifellos bestehen auch andere Möglichkeiten einer Beeinflussung des Pilzes durch das zugeführte Präparat. Zu denken wäre in diesem Zusammenhang wohl in erster Linie an eine Umstimmung des Stoffwechsels der Pflanze durch die nach Entfernen der Kotyledonen verstärkt aufgenommenen Substanzen, ihre Bausteine oder auch durch möglicherweise in der Pflanze neu entstehende Verbindungen. Anhaltspunkte für eine derartige Annahme ergeben sich unter anderem aus Arbeiten von ZINSMEISTER (1964) sowie ZINSMEISTER und HÖLLMÜLLER (1964), in denen auf die Bildung von Chinon-Indol-Komplexverbindungen hingewiesen wird, welche die pflanzeigene IES blockieren.

Chinalizarin hat bei allen Applikationsformen eine ähnliche Wirkung wie Rufiansäure, allerdings in weniger ausgeprägter Form. Wahrscheinlich ist dies auf die geringe Löslichkeit dieser Substanz zurückzuführen.

Grundsätzlich anders verhält sich dagegen Tannin. Die bei Infiltration dieses Inhibitors in Kartoffelknollengewebe bzw. Bohnenhypokotyle ebenso wie bei Resorption der

Lösung durch abgeschnittene Keimlinge hervorgerufene Mazerationsförderung kommt in Anbetracht der starken Hemmwirkung auf die Enzyme in vitro gänzlich unerwartet. Sie scheint auf einen Abbau des Moleküls hinzudeuten. Hierbei könnten über Digallussäure als Endprodukte die in den vorliegenden Untersuchungen als Inhibitoren weitgehend unwirksamen und nur wenig fungitoxischen niedermolekularen Phenole (Gallussäure u. a.) entstehen.

Da bei einem derartigen Abbau gleichzeitig aus jeweils einem Molekül Tannin (= Penta $\underline{\text{m}}$ - digalloyl-7-glukose) ein Molekül Glukose freigesetzt wird (HASLAM 1966, KLAGES 1958), läßt sich die beobachtete Förderung der Pilzausbreitung umso besser erklären, wenn man hierzu die bereits zitierten Befunde von HORTON und KEEN (1964, 1966), daß unterschwellige Glukosemengen die Enzymaktivität fördern, mit in die Überlegungen einbezieht (zum Tanninabbau vgl. auch BERG 1964).

Enzymatischer Abbau der Tannine ist zwar bereits bei einer ganzen Reihe von Mikroorganismen nachgewiesen worden (u.a. BAZZIGHER 1957, DOMSCH 1965, JACKSON 1965) und die Möglichkeit besteht, daß auch Rhizoctonia solani hierzu in der Lage ist, jedoch scheinen bisher keine direkten Beweise dafür vorzuliegen. Gegen eine solche Fähigkeit spricht der in den Untersuchungen über die Fungitoxizität der Inhibitoren zu beobachtende hemmende Effekt des Tannins auf das Wachstum des Pilzes auf Glukose-Agar.

Eine andere Möglichkeit wäre die, daß das Molekül durch die Pflanze abgebaut wird. GROSSMANN (1962d) beobachtete farbliche Veränderungen einer Tanninlösung unter dem Einfluß von Tomatenwurzeln, die nach 3 Tagen in einem weitgehenden Verlust der Hemmwirkung dieser Lösung gegenüber pektischen Enzymen resultierten. Ein aktiver enzymatischer Abbau durch das Gewebe konnte zwar durch eine entsprechende Versuchsanordnung ausgeschaltet werden, jedoch ist nicht auszuschließen, daß auch allein durch reaktionsfähige Gewebebestandteile ein Zerfall des Moleküls herbeigeführt werden kann.

Der Einfluß von Tannin oder seiner Bausteine auf die Intensivierung oder Hemmung der β -Indolylessigsäure sei in diesem Zusammenhang ebenfalls erwähnt (ZINSMEISTER 1964, ZINSMEISTER und HÖLLMÜLLER 1964). Er scheint jedoch noch nicht genügend geklärt, als daß er hinsichtlich der beobachteten Aktivierung des Pilzes auf dem mit diesen Substanzen angereicherten Gewebe eingehender diskutiert werden könnte. Schließlich wäre auch in Erwägung zu ziehen, daß durch die Gerbwirkung des Tannins auf die Proteinbestandteile des Protoplasmas einerseits eine Adsorption des Inhibitors und andererseits eine gleichzeitige Freisetzung von Zellinhaltsstoffen erfolgt, die ebenfalls zu einer verstärkten Pilzentwicklung im Vergleich zu den Kontrollen führen könnte.

Auf den Pilzbefall bewurzelter Keimpflanzen im Gewächshaus bleibt Tannin dagegen wirkungslos. In dieser Hinsicht ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den Untersuchungen von GROSSMANN (1962d) an welkekranken Tomatenpflanzen. Die Annahme, daß das Molekül wegen seiner Größe (Molekulargewicht etwa 1700) nur ungenügend in die Pflanzen aufgenommen wird, scheint daher auch für die eigenen Untersuchungen zuzutreffen.

Digallussäure zeigte in allen Versuchen eine mit dem Tannin weitgehend übereinstimmende Wirkungsweise. Für sie gelten im Prinzip die gleichen Überlegungen wie für Tannin, da sie als Bestandteil desselben zu den gleichen Grundbausteinen, mit Ausnahme der Glukose, abgebaut werden kann.

Alkylarylsulfonat vermindert den Pilzbefall bei allen Applikationsformen in gesichertem Ausmaß, was vermutlich auf die hohe Fungitoxizität dieser zu den Detergentien zählenden Verbindung zurückzuführen ist. Dies kann schon daraus geschlossen werden, daß der Effekt, im Gegensatz zu den bisher diskutierten Substanzen, sowohl an Keimpflanzen mit als auch an solchen ohne Kotyledonen zu beobachten ist. Für eine solche Annahme spricht ferner, daß während der Fertigstellung dieser Arbeit Veröffentlichun-

gen erschienen sind, die auf die Toxizität derartiger Substanzen gegenüber dem Bakterium Staphylococcus aureus (VOSS 1965) und ihre Wirksamkeit bei der Bekämpfung von Plasmopara viticola und Peronospora destructor (ALEXANDRI et al. 1965) hinweisen. Ein weiterer Hinweis hierfür ergibt sich schließlich daraus, daß das als Fungizid bekannte F 461 in einigen Vergleichsversuchen ähnlich wie Alkylarylsulfonat wirkte.

Die in den vorliegenden Versuchen festgestellte hohe Phytotoxizität des Präparates scheint in Untersuchungen anderer Autoren nicht in diesem Maße beobachtet worden zu sein (MEYER 1960, DEN DULK 1960). Möglicherweise sind hierfür die unterschiedlichen Adsorptionskräfte der jeweils verwendeten Böden verantwortlich zu machen.

Auf die Bedeutung von Toxinen beim Zustandekommen der Krankheitssymptome von Rhizoctonia solani ist in den letzten Jahren verschiedentlich hingewiesen worden (SHERWOOD und LINDBERG 1962, WYLLIE 1962, WU 1965, NOUR EL DEIN und SHARKAS 1965). Über ihre Beeinflussbarkeit durch zugeführte Agenzien scheinen jedoch bisher keine Ergebnisse vorzuliegen. Eine eingehendere Diskussion dieser Frage ist daher vorläufig nicht möglich.

Abschließend soll noch eine Antwort auf die Grundfrage der gesamten Arbeit - ob es nämlich möglich sei, in den durch Rhizoctonia solani hervorgerufenen Krankheitsprozeß durch Hemmung der pektischen und zellulolytischen Enzyme des Erregers einzugreifen - versucht werden.

Diese Frage kann nur für Rufiansäure und evtl. Chinalizarin einigermaßen positiv beantwortet werden. Aber selbst bei diesen beiden Hemmstoffen sind andersartige Wirkungsmechanismen nicht auszuschließen. Bei Tannin und Digallussäure verhindert der vermutliche Abbau oder die Adsorption der Inhibitor-Moleküle, bei Alkylarylsulfonat die hohe Fungitoxizität eine eindeutige Interpretation.

E. ZUSAMMENFASSUNG

=====

1. Ein Zusatz von 0,2 M Phosphatpuffer bei der Kultur von Rhizoctonia solani auf einer Nährlösung verhindert das sonst zu beobachtende Ansteigen des pH-Wertes über den für die Polygalakturonase (PG)- und Zellulase (C_x)-Synthese optimalen Bereich. Die Ausbeute an beiden Enzymen wird damit erhöht. Das Maximum der Enzymaktivität wird in Ruhekulturen bei 27°C um den 13. Tag erreicht. Die Aktivität der beiden Enzyme bleibt über einen längeren Zeitraum auf etwa gleicher Höhe, so daß Ergebnisse vergleichender Enzymuntersuchungen weniger von der Zufälligkeit des Untersuchungszeitpunkts beeinflusst werden.
2. Auf Pektin entwickelt der Pilz die höchste PG-, auf Carboxymethylzellulose die höchste C_x -Aktivität. In beiden Fällen führt die gleichzeitige Zugabe höherer Anteile von Glukose zu den Medien zu einer Verminderung der Enzymaktivität bei gleichzeitigem Ansteigen der Myzelgewichte.
3. Die Höhe der innerhalb von 9 Tagen in einer Pektin und Carboxymethylzellulose enthaltenen Nährlösung feststellbaren Enzymaktivität ist ebenso wie das erzielte Myzeltrockengewicht von der Vorkultur des Inokulums abhängig. Als bestes Anzuchtmedium erwies sich Biomalz-Agar unter Zusatz eines Dekoktes aus Bohnenkeimlingen. Die Vorkultur des Inokulums auf einem Pektin und Zellulose enthaltenden Agarmedium ergab die niedrigsten Werte, was offenbar auf die sehr spärliche Myzelentwicklung auf diesem Nährboden zurückzuführen ist.
4. Auch die Aggressivität des Pilzes, gemessen an der Mazeration pflanzlicher Gewebe, ist in hohem Maße durch die Vorkultur beeinflussbar.

5. Eine größere Zahl organischer und anorganischer Verbindungen wurde auf ihre Hemmwirkung sowohl gegenüber der PG als auch gegen eine Zellulase vom C_x -Typ, eine kleinere Anzahl außerdem gegenüber der PME von Rhizoctonia solani geprüft. Als besonders wirksamer Inhibitor erwies sich ein Alkylarylsulfonat. Weiterhin zeigten Tannin, Digallussäure, p-Chlormercuribenzoessäure, α -Naphthol, einige Chinone und Carbamate sowie verschiedene Schwermetallsalze (Hg, Ag, Cu) einen sehr guten Hemmeffekt.
6. Von den wirksamsten Inhibitoren waren Tannin, Digallussäure, Chinalizarin und Rufiansäure bei unmittelbarer Einwirkung auf den Pilz am wenigsten toxisch. Die Fungitoxizität von Alkylarylsulfonat war demgegenüber außerordentlich hoch.
7. Nach Infiltration in Kartoffelknollengewebe förderten Tannin und Digallussäure dessen Mazeration durch Rhizoctonia solani. Die Infiltration von Chinalizarin war ohne nennenswerten Einfluß, Alkylarylsulfonat hemmte den Befallsverlauf signifikant. Rufiansäure bewirkte nur dann eine Verminderung der Gewebemazeration, wenn die Knollen vor der Infiltration geschält und für 48 Std. einer Temperatur von 27° C ausgesetzt worden waren. Wahrscheinlich ist dies auf die unter diesen Bedingungen verstärkte Aufnahme des Inhibitors in das Gewebe zurückzuführen.
8. Infiltration der Hemmstoffe in Bohnenhypokotyle führte zu gleichsinnigen Ergebnissen. Rufiansäure hemmte hierbei den Befallsverlauf auch ohne besondere Vorbehandlung der Gewebe.
9. Tannin und Digallussäure förderten die Mazeration von Bohnenhypokotylen durch Rhizoctonia solani besonders stark, wenn die Keimpflanzen nach Abschneiden der Wurzeln in Lösungen der beiden Verbindungen eingestellt

worden waren und eine größere Menge davon resorbiert hatten. Bei dieser Applikationsform sind Chinalizarin und Rufiansäure ohne gesicherten Einfluß, während Alkylarylsulfonat wieder hemmend wirkt.

10. Gießversuche mit den in vitro wirksamen Inhibitoren zu bewurzelten Bohnenkeimlingen in Sandkultur führten, abgesehen von Alkylarylsulfonat, zunächst zu keiner Beeinflussung des Pilzbefalls. Wurden jedoch im Alter von 5 Tagen die Kotyledonen der Pflanzen entfernt und zusammen mit den Inhibitoren Nährstoffe über die Wurzel zugeführt, so hemmten auch Chinalizarin und Rufiansäure den Pilzbefall signifikant. Tannin und Digallussäure blieben unter diesen Bedingungen ohne Wirkung.
11. Mögliche Gründe für die Unterschiede zwischen der Hemmwirkung der Substanzen gegenüber den pektischen und zellulolytischen Enzymen in vitro und ihrem Einfluß auf den Pilzbefall in vivo werden diskutiert. Es ist anzunehmen, daß die durch Applikation von Tannin und Digallussäure zu Kartoffelgewebe und Bohnenhypokotylen verursachte Förderung der Mazeration dieser Gewebe auf einen Abbau der beiden Substanzen zurückzuführen ist, wobei wenig toxische und im Hinblick auf die Enzymhemmung weitgehend unwirksame einfache Phenole freigesetzt werden. Aus der nur nach Entfernen der Kotyledonen zu beobachtenden Verminderung des Pilzbefalls durch Wurzelapplikation von Rufiansäure und Chinalizarin an Bohnenkeimlingen ergeben sich Anhaltspunkte, die auf eine teilweise Blockierung pektischer und zellulolytischer Enzyme des Erregers in vivo hindeuten. Direkte Beweise hierfür bestehen jedoch nicht. Andere Wirkungsmechanismen werden daher ebenfalls in Erwägung gezogen. - Der durchgehend hemmende Einfluß von Alkylarylsulfonat dürfte dagegen mit großer Wahrscheinlichkeit auf der starken Fungitoxizität dieser Verbindung beruhen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- | | | |
|---|-------|--|
| Abo-El-Dahab, M.K. | 1964 | Production of pectic and cellulolytic enzymes by <u>Xanthomonas malvacearum</u> . <u>Phytopathology</u> <u>54</u> , 597 |
| Alexandri, A.,
Baicu, T.,
Minicou, N.,
Josifescu, M. | 1965 | Cercetări asupra folosirii în protecția plantelor a unor muianți produși în R.P.R. <u>Lucr. științ. Inst. Cerc. hortivitic.</u> <u>6</u> , 873-883 (Rev. appl. Mycol. <u>45</u> , 1966, 133) |
| Aoki, H.,
Sassa, T.,
Tamura, T. | 1963 | Phytotoxic metabolites of <u>Rhizoctonia solani</u> . <u>Nature, Lond.</u> <u>200</u> , 575 |
| Ayers, W.A.
Papavizas, G.C.,
Dien, A.F. | 1966 | Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by <u>Rhizoctonia solani</u> . <u>Phytopathology</u> <u>56</u> , 1006-1011 |
| Barker, K.R.,
Walker, J.C. | 1962 | Relationship of pectolytic and cellulolytic enzyme production by strains of <u>Pellicularia filamentosa</u> to their pathogenicity. <u>Phytopathology</u> <u>52</u> , 1119-1125 |
| Bateman, D.F. | 1963a | The "macerating enzyme" of <u>Rhizoctonia solani</u> . <u>Phytopathology</u> <u>53</u> , 1178-1186 |
| -,- | 1963b | A mechanism of induced host resistance to polygalacturonase in <u>Rhizoctonia</u> -infected tissue- <u>Phytopathology</u> <u>53</u> , 870 |
| -,- | 1963c | Pectolytic activities of culture filtrates of <u>Rhizoctonia solani</u> and extracts of <u>Rhizoctonia</u> -infected tissues of bean. <u>Phytopathology</u> <u>53</u> , 197-204 |
| -,- | 1964a | An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in <u>Rhizoctonia</u> -infected hypocotyls of bean. <u>Phytopathology</u> <u>54</u> , 438-445 |
| -,- | 1964b | Cellulase and the <u>Rhizoctonia</u> disease of bean. <u>Phytopathology</u> <u>54</u> , 1372-1377 |

- | | | |
|-------------------------|---------|---|
| Bateman, D.F. | 1965 | Loss of birefringence of cell walls in <u>Rhizoctonia</u> -infected tissue. <u>Phytopathology</u> <u>55</u> , 494 |
| -, - and Rogowicz, J.C. | 1964/65 | Host pectins and pathogenesis by <u>Rhizoctonia</u> . Cornell Plantations <u>20</u> , 54-56 |
| -, - and Beer, S.V. | 1965 | Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by <u>Sclerotium rolfsii</u> . <u>Phytopathology</u> <u>55</u> , 204 |
| -, - and Lumsden, R.D. | 1965 | Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of <u>Rhizoctonia solani</u> . <u>Phytopathology</u> <u>55</u> , 734-738 |
| -, - and Maxwell, D.F. | 1965 | Phenol oxidase activity in extracts of <u>Rhizoctonia solani</u> infected hypocotyls of bean and its distribution in relation to lesion areas. <u>Phytopathology</u> <u>55</u> , 127 |
| -, - and Millar, R.L. | 1966 | Pectic enzymes in tissue degradation. <u>A. Rev. Phytopath.</u> <u>4</u> , 119-146 |
| Bazzigher, G. | 1957 | Tannin- und phenolspaltende Fermente dreier parasitischer Pilze. <u>Phytopath. Z.</u> <u>29</u> , 299-304 |
| Berg, W. | 1964 | Wechselwirkung zwischen Parasit und Wirt bei Tracheomykosen. <u>Beitr. Biol. Pfl.</u> <u>40</u> , 389-449 |
| Braune, W. | 1964 | Chinone als Fungizide. Die Geschichte ihrer Erforschung und die Ansichten über ihre Wirkungsweise. <u>Zentbl. Bakt. ParasitKde.</u> <u>Abt. 2</u> , 412-424 |
| Bresch, C. | 1964 | Klassische und molekulare Genetik. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg |

- | | | |
|---|------|--|
| Brown, W. | 1915 | Studies in the physiology of parasitism. I. The action of <u>Botrytis cinerea</u> . Ann. Bot. <u>29</u> , 313-348 |
| Brown, W. | 1965 | Toxins and cell - wall dissolving enzymes in relation to plant disease. A. Rev. Phytopath. <u>3</u> , 1-18 |
| Buhse, G. | 1965 | Beeinträchtigung der Binnengewässer und Gewässerbelastung als Folge naturfremder Maßnahmen. Anzeiger f. Schädlingsk. <u>12</u> , 177-180 |
| Corden, M.E.,
Elson, J.E.,
Bell, L. | 1964 | Inhibition of polygalacturonase (produced by <u>Fus. oxysp. f. lycopersici</u>) by cations. Phytopathology <u>54</u> , 1432 |
| Christou, Th. | 1962 | Penetration and host-parasite relationships of <u>Rhizoctonia solani</u> in the bean plant. Phytopathology <u>52</u> , 381-389 |
| Deese, D.C.,
Stahmann, M.A. | 1952 | Pectic enzymes and cellulase formation by <u>Fus. oxysp. f. cubense</u> on stem tissues from resistant and susceptible banana plants. Phytopathology <u>52</u> , 247 |
| Den Dulk, P.R. | 1960 | Synthetic detergents in sewage sludge. Neth. J. agric. Sci., 129-142 |
| Dixon, W.J.,
Mood, A.M. | 1946 | The statistical sign test. J. of the Amer. Statist. Assoc. <u>41</u> , 557-566 |
| Domsch, K.H. | 1965 | Der Einfluß von Captan auf den Abbau von Glukose, Aesculin, Chitin und Tannin im Boden. Phytopath. Z. <u>52</u> , 1-18 |
| Durbin, R.D.,
Huppler, J.D. | 1965 | Some problems in the determination of hydrolytic enzyme activity. Phytopathology <u>55</u> , 471-472 |
| Farkas, G.L.,
Király, Z. | 1964 | Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease resistance. Phytopath. Z. <u>44</u> , 105-150 |

- Fisher, K.D. 1965 Hydrolytic enzyme and toxin production by sweetpotato Fusaria. Phytopathology 55, 396-398.
- Fuchs, A. 1965 On the gelation of pectin by plant extracts and its inhibition. Acta bot. neerl. 14, 315-322
- Großmann, F. 1962a Therapeutische Wirkung von Pektinase-Hemmstoffen gegen die Fusarium-Welke der Tomate. Naturwissenschaften 49, 138-139
- , - 1962b Untersuchungen über die Hemmung pektolytischer Enzyme von Fusarium oxysporum f. lycopersici. I. Hemmung durch definierte Substanzen in vitro. Phytopath. Z. 44, 361-380
- , - 1962c Untersuchungen über die Hemmung pektolytischer Enzyme von Fusarium oxysporum f. lycopersici. II. Hemmung durch Pflanzenextrakte in vitro. Phytopath. Z. 45, 1-20
- , - 1962d Untersuchungen über die Hemmung pektolytischer Enzyme von Fusarium oxysporum f. lycopersici. III. Wirkung einiger Hemmstoffe in vivo. Phytopath. Z. 45, 139-159
- , - 1964 Über die Hemmung pektolytischer Enzyme von Alternaria solani und die Wirkung einiger Hemmstoffe auf die Sporenkeimung und Infektion. Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz 71, 148-153
- , - 1967 Versuche zur Hemmung einer Cellulase von Fusarium oxysporum f. lycopersici. Zentbl. Bakt. ParasitKde. Abt. 2 (im Druck)
- Hadley, G., Perombelon, M. 1963 Production of pectic enzymes by Rhizoctonia solani and orchid endophytes. Nature, Lond. 200, 1337
- Hall, G.B. 1966 Inhibition of tomato pectin-esterase by tannic acid. Nature, Lond. 212, 717-718

- | | | |
|---------------------------------|------|--|
| Hancock, J.G. | 1966 | Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by <u>Sclerotinia sclerotiorum</u> in sunflower and tomato stems. Phytopathology <u>56</u> , 975-979 |
| Heinen, W.,
Brand, v. d., I. | 1962 | Enzymatische Aspekte zur Biosynthese des Blatt-Cutins bei <u>Gasteria verrucosa</u> -Blättern nach Verletzung. Z. Naturf. <u>18</u> , 67-79 |
| Henglein, F.A. | 1958 | Die Uron- und Polyuronsäuren (Pektin und Algin säure). In: W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. VI, 405-478, Springer-Verlag, Berlin usw. |
| Hofferbert, W.,
Orth, H. | 1951 | Unsere Arbeiten zur <u>Rhizoctonia</u> -Frage bei der Kartoffel. I. Teil. Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz <u>58</u> , 245-258 |
| Hoffmann-Ostenhof, O. | 1954 | Enzymologie. Springer-Verlag, Wien |
| Horton, J.C. | 1964 | Extracellular pectolytic and cellulolytic enzymes of <u>Pyrenochaeta terrestris</u> . Iowa St. J. Sci. <u>71</u> , 84-88 |
| -, - and
Keen, N.T. | 1964 | Glucose inhibition of cellulase synthesis by <u>Pyrenochaeta terrestris</u> . Iowa St. J. Sci. <u>71</u> , 88-91 |
| -, - and
Keen, N.T. | 1966 | Sugar repression of endopolygalacturonase and cellulase synthesis during pathogenesis by <u>Pyrenochaeta terrestris</u> as a resistance mechanism in onion pink root. Phytopathology <u>56</u> , 908-916 |
| Musain, A.,
Rich, S. | 1958 | Extracellular pectic and cellulolytic enzymes of <u>Gladospodium cucumerinum</u> . Phytopathology <u>48</u> , 316-320 |
| Israel, O.P.,
Shah Ali, M. | 1964 | Effect of carbohydrates on the growth of <u>Rhizoctonia solani</u> Kühn. Biologia Pl., 84-87 |

- | | | |
|---------------|-------|---|
| Jackson, R.M. | 1965 | Studies of fungi in pasture soils III. Physiological studies on some fungal isolates from the root surface and from organic debris. N.Z.Jl. agric. Res. 8, 878-888 |
| Joslyn, A.M. | 1962 | The chemistry of protopectin: a critical review of historical data and recent developments. Adv. in Food Res.-Vol. 11, 1-107 |
| Kertesz, Z.J. | 1951 | Pectic enzymes. - In: J. B. Sumner u. K. Myrbäck. The enzymes. Vol. I, Part. 2, 745-768, New York |
| Kertesz, Z.I. | 1955 | Pectic enzymes. In: S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Methods in enzymology, I, 158-166, Academic Press, New York |
| Klages, F. | 1958 | Lehrbuch der org. Chemie, III. Bd. Sondergebiete, Verlag Walter De Gruyter u. Co. Berlin |
| Lyr, H. | 1959a | Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. I. Mitteilung. Pectin als C-Quelle. Arch. Mikrobiol. <u>33</u> , 266-282 |
| -, - | 1959b | Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. Cellulose als C-Quelle. Arch. Mikrobiol. <u>34</u> , 189-203 |
| -, - | 1959c | Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. IV. Mitteilung. Xylan und Glucose als C-Quellen. Arch. Mikrobiol. <u>34</u> , 418-433 |
| -, - | 1960 | Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. V. Mitteilung (Schluß). Ein komplexes Medium als C-Quelle. Arch. Mikrobiol. <u>35</u> , 258-278 |

- | | | |
|---|------|---|
| Lyr, B. | 1961 | Hemmungsanalytische Untersuchungen an einigen Ektoenzymen holzzerstörender Pilze.
Enzymologia 4, 231-248 |
| Mader, H. | 1958 | Cutin. In: W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. X, Springer Verlag Berlin, 270-281 |
| Mandels, M.,
Reese, E.T. | 1963 | Inhibition of cellulases and β -glucosidases. In: Adv. in enzymic hydrolysis of cellulose and related material.
Symp. publ. Div. Pergamon Press. Oxford-London-New York-Paris, 115-157 |
| Mandels, M.,
Reese, E.T. | 1965 | Inhibition of cellulases. A. Rev. Phytopath. Vol. III, 85-102 |
| Mayer, J.A.,
Garber, E.D.,
Shaeffer, S.G. | 1964 | Effect of buffers on the pectolytic activity of culture filtrates of <u>Fus. oxysp.</u>
Nature, Lond. 202, 414-415 |
| McClendon, J.H. | 1964 | Evidence for the pectic nature of the middle lamella of potato tuber cell walls based on chromatography of macerating enzymes.
Am. J. Bot. 51, 628-633 |
| Meyer, E. | 1960 | Mitt. Inst. f. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz, Techn. Hochsch. Hannover, 18 (1963, Fortschr. d. Bot. 26, 396) |
| Mothes, K. | 1933 | Die Vakuuminfiltration im Ernährungsversuch. Planta 19, 117-138 |
| Norkrans, B. | 1963 | Degradation of Cellulose. A. Rev. Phytopath. 1, 325-350 |
| Nour El Dein, M.S.,
Sharkas, M.S. | 1963 | Pectolytic enzyme activity of <u>Rhizoctonia solani</u> . Phytopath. Z. 48, 439-444 |
| Nour El Dein, M.S.,
Sharkas, M.S. | 1965 | Isolation of a toxic substance from the culture filtrate of <u>Rhizoctonia solani</u> . Phytopath. Z. 52, 55-58 |
| Owens, R.G. | 1963 | Chemistry and physiology of fungicidal action. A. Rev. Phytopath. 1, 77-100 |

- Pandey, D.K.,
Gupta, S.C. 1966 Studies in pectic enzymes of parasitic fungi VI. Factors affecting the secretion of pectic enzymes by Alternaria tenuis. Biologia Pl. 8, 131-141
- Papavizas, G.C.,
Ayers, W.A. 1965 Virulence, host range and pectolytic enzymes of single-basidiospore isolates of Rhizoctonia praticola and Rhizoctonia solani. Phytopathology 55, 111-118
- Ranby, B.G. 1958 Cellulosen und ähnliche Wandsubstanzen von Kohlenhydratnatur, z. B. Hemicellulosen (Struktur, Eigenschaften und Verbreitung). Handbuch der Pflanzenphysiologie 6, 268-304
- Reese, E.T. 1963 Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials Symp. publ. Div. Pergamon Press. Oxford-London-New York-Paris, 115-157
- , and
Siu, R.G.H.,
Levinson, H.S. 1950 The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. Bact. 59, 485-497
- Richter, H.,
Schneider, R. 1953 Untersuchungen zur morphologischen und biologischen Differenzierung von Rhizoctonia solani K. Phytopath. Z. 20, 167-226
- Schmeling, v.B.,
Kulka, M. 1966 Systemic fungicidal activity of 1,4-Oxathiin-derivatives. Science 152, 659-660
- Sherwood, R.T. 1964 Pectin trans-eliminase and polygalacturonase production by Rhizoctonia solani and other fungi. Phytopathology 54, 907
- Sherwood, R.T. 1966 Pectin lyase and polygalacturonase production by Rhizoctonia solani and other fungi. Phytopathology 56, 279-286
- , and
Lindberg, C.G. 1962 Production of a phytotoxin by Rhizoctonia solani. Phytopathology 52, 586-587

- ,- and Kelman, A. 1964 Measurement of pectinolytic and cellulolytic enzyme activity by rotating spindle viscometry. *Phytopathology* 54, 110-112
- Sprecher, E. 1963 Das Wachstum von Pilzen in Abhängigkeit von der Impfstückgröße. *Zentbl. Bakt. ParasitKde. Abt. 2*, 410-420
- Steiner, G.W., Watson, R.D. 1965 The effect of surfactants on growth of fungi. *Phytopathology* 55, 1009-1012
- Strider, D.L., Winstead, N.N. 1961 Production of cell-wall dissolving enzymes by Cladosporium cucumerinum in cucumber tissue and in artificial media. *Phytopathology* 51, 765
- Tomiyama, K. 1963 Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. *A. Rev. Phytopath. Vol. I*, 295-324
- Voss, J.G. 1965 Effect of inorganic cations on bactericidal activity of anionic surfactants. *J. Bact.* 86, 207-211
- Waggoner, P.E., Dimond, A.E. 1955 Production and role of extra-cellular pectic enzymes of Fusarium oxysporum f. lycopersici. *Phytopathology* 45, 79-85
- Wood, R.K.S. 1960 Pectic and cellulolytic enzymes in plant diseases. *A. Rev. Pl. Physiol. Vol. 11*, 299-322
- Wood, R.K.S. 1961 Verticillium wilt of tomatoes-The role of pectic and cellulolytic enzymes. *Ann. Appl. Biol.* 49, 120-139
- Wu, L.C. 1966 Physiology of parasitism. I. Growth, pathogenicity, and toxin production of Rhizoctonia solani Kuehn. *Bot. Bull. Acad. sin Taipei*, 144-152
- Wyllie, D. 1962 Effect of metabolic by-products of Rhizoctonia solani on the roots of chippewa soybean seedlings. *Phytopathology* 52, 202-206

- Zinsmeister, H.D. 1964 Gerbstoffe und Wachstum I. Der Einfluß von chinesischem Tannin auf Wachstum und Wuchsstoff-Wirkung. *Planta* 61, 130-141
- , - und 1964 Gerbstoffe und Wachstum II. Die Höllmüller, W. Wirkung einiger Gerbstoffbausteine auf das Wachstum von Getreide-koleoptilen. *Planta* 63, 133-145.
- Zogg, H. 1957 Über die Beeinflussung von Pathogenität und Wachstum pflanzlicher Parasiten I. Wirkung der Vorkultur auf verschiedene Fußkrankheitserreger bei Getreide. *Phytopath. Z.* 208, 423-426

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. F. Großmann, bin ich für die Überlassung des Themas, seine wertvollen wissenschaftlichen Anleitungen und die mir gewährte finanzielle Unterstützung zu ganz besonderem Dank verpflichtet.

Weiterhin danke ich auch den Angehörigen des Instituts für Phytopathologie für ihr freundliches Entgegenkommen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 5. 3. 1933 wurde ich als Sohn des Landwirts Anton Martin und dessen Ehefrau Regina, geb. Faubel, in Ruhlkirchen, Krs. Alsfeld geboren.

Nach 8-jähriger Volksschulzeit, von 1939 - 1947, arbeitete ich zunächst im elterlichen Betrieb.

In den Winterhalbjahren 1952/53 und 1953/54 besuchte ich die Landwirtschaftsschule in Alsfeld. Vom 1. April 1953 bis 31. März 1954 war ich als Landwirtschaftslehrling auf dem Betrieb des Landwirts Josef Schulte in Angenrod, Krs. Alsfeld, Im April 1954 legte ich die Gehilfenprüfung ab.

Anschließend arbeitete ich wieder im elterlichen Betrieb und nebenberuflich in verschiedenen anderen Berufszweigen, u. a. in der Düngemittelabteilung der Farbwerke Höchst.

Mit Abschluß des Besuchs der Höheren Landbauschule in Michelstadt (Odw.) im November 1957 wurde mir die Eignung zum Hochschulstudium zuerkannt.

Von November 1957 bis Oktober 1959 studierte ich Landwirtschaft an der Justus Liebig-Universität Gießen und von 1959 bis 1961 Pädagogik am Pädagogischen Institut zu Weilburg. Mein Wahlfach war Biologie. Die 1. Staatsprüfung für das Lehramt an Volks- und Realschulen legte ich im Juli 1961 ab.

Ab 1. August 1961 bis 30. Juli 1963 war ich als apl. Lehrer an der Volksschule in Seibelsdorf, Krs. Alsfeld tätig. Danach beendete ich mein Landwirtschaftsstudium mit der Diplomprüfung im Juni 1964.

Seit dieser Zeit bin ich am Institut für Phytopathologie der Justus Liebig-Universität Gießen mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation beschäftigt.

